

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M^{me} Marie-Hélène LAUR

1^{re} THÈSE. — “ LES LIPIDES DE QUELQUES RHODOPHYCÉES
(RECHERCHES CYTOCHIMIQUES, CHIMIQUES ET
PHYSIOLOGIQUES), ”

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :
“ LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE :
APPLICATIONS AUX LIPIDES DES VÉGÉTAUX, ”

Soutenues le 1964 devant la Commission d'examen.

MM. EICHHORN.....	Président.
FELDMANN	} Examinateurs.
CHOUARD.....	
PAQUOT.....	

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1965

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M^{me} Marie-Hélène LAUR

1^{re} THÈSE. — “ LES LIPIDES DE QUELQUES RHODOPHYCÉES
(RECHERCHES CYTOCHIMIQUES, CHIMIQUES ET
PHYSIOLOGIQUES), ”

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :
“ LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE :
APPLICATIONS AUX LIPIDES DES VÉGÉTAUX, ”

Soutenues le

devant la Commission d'examen.

MM. EICHHORN..... *Président.*

FELDMANN
CHOUARD.....
PAQUOT..... } *Examineurs.*

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1965



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. ZAMANSKY

Professeurs :

G. JULIA	T Anal. sup. et alg. sup.	NORMANT ...	T Synthèse organique gén.
PRENANT	T Anat. et histol. comparées.	BENARD	T Chimie minérale.
GRASSÉ.	T Evol. des êtres organisés.	BUVAT.....	T Botanique (E.N.S.)
PRÉVOST	T Chimie organique.	DUGUÉ.....	T Statist. mathématiques.
WYART	T Minéralogie et cristallogr.	SOULAIRAC ..	T Psychophysiologie.
TEISSIER.....	T Zoologie.	ULRICH	T Physiol. végét.
MANGENOT ..	T Biologie vég. (Orsay).	MARÉCHAL... T	Optique théor. et appl.
AUGER	T Phys. quant. et relativité.	KIRRMANN ...	T Théories chimiques.
MONNIER	T Physiol. générale.	CHADEFAUD ..	T Botanique.
PIVETEAU	T Paléontologie.	M ^{lle} LE BRETON	T Physiologie de la Nutrit.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	LELONG.....	T Applic. de l'analyse à la géométrie.
CARTAN T	Mathématiques (E.N.S.).	DEVILLERS ..	T Anatom. et Histol. Comp.
LAFFITTE	T Chimie générale	EHRESMANN ..	T Topologie algébrique.
FAYARD T	Géométrie supérieure.	FRANÇON.....	T Physique (S.P.C.N.).
COULOMB	T Physique du Globe.	GLANGEAUD ..	T Géogr. Phys. et Géol. dyn.
M ^{lle} COUSIN. ...	T Biolog. animale (S.P.C.N.)	GODEMENT ...	T Mathématiques (M.G.P.).
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	PISOT T	Tech. Mathém. de la Phys.
DRACH T	Zoologie.	ROCH.....	T Géologie.
KASTLER.....	T Physique (E.N.S.).	SCHATZMAN... T	Astrophysique.
EPHRUSSI ...	T Génétique.	TERMIER.....	T Géologie générale.
RIVIÈRE.....	T Géologie SPCN et Sédim.	ZAMANSKY... T	Mathémat. générales.
GAUTHIERET..	T Biologie végétale (P.C.B.).	LENNUIER ...	T Physique (M.G.P.).
R. LUCAS	T Recherches physiques.	RIZET T	Génétique (Orsay).
A. THOMAS ...	T Biologie cellulaire.	ROUTHIER ...	T Géologie appliquée.
ARNULF T	Optique appliquée.	M ^{me} TONNELAT	T Physique théorique.
MORAND T	Physique enseignement	DIXMIER.....	T Mathématiques (M.P.C.).
SOLEILLET ...	T Physique (P.C.B.).	SOUCHAY	T Chimie générale.
FORTIER T	Mécan. expér. des fluides.	AIGRAIN.....	T Electrotech. générale.
PETIT T	Biologie maritime.	BRUSSET	T Chimie systématique.
QUENEY T	Météorol. et dyn. atmosph.	M. LÉVY	T Physique théorique des Hautes Energies (Orsay)
GALLIEN	T Embryologie.	M ^{me} CHAIX... T	Chimie biologique.
EICHHORN ...	T Botanique.	M ^{me} HUREL-PY	T Biologie végétale (P.C.B.).
DE CUGNAC ...	T Biologie végét. (S.P.C.N.).	PIAUX T	Chimie (M.P.C.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.	BRUN..... T	Mécan. théor. des fluides.
THELLIER ...	T Physique du globe.	LEDERER	T Chimie biologique. (Ors.).
L'HERITIER..	T Biolog. gén. (Orsay).	M ^{me} DUBREIL	T Mathémat. (Agrég.).
GRIVET T	Radioélectricité (Orsay).	M ^{me} LE LONG ..	T Mathémat. II (E.N.S.).
PONCIN T	Mécanique générale.	BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.).
DUBREIL.....	T Arith. et théor. des nombr.	COTTE T	Physique électricité.
QUELET..... T	Chimie organique.	J. E. DUBOIS	T Chimie organique.
CAGNIARD ...	T Géophysique appliquée.	LAMOTTE	T Zoologie (E.N.S.).
CHAMPETIER..	T Chimie macromoléculaire.	A. MICHEL... T	Chimie minérale (Orsay).
CUVILLIER ...	T Micropaléontologie.	OLMER T	Energétique générale.
JUNG T	Géologie	ROUAULT ...	T Electricité (Orsay).
TRILLAT	T Microscop. et diff. électr.	GAUTHIER... T	Mécanique appliquée.
WIEMANN	T Chimie organ. et struct.	BARCHEWITZ.	T Chimie physique.
JACQUINOT ...	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).	BROSSEL	T Physique atomique.
VASSY T	Phys. de l'atmosphère.	BUSER T	Physiologie comparée.
DESTOUCHES	T Théories physiques.	CAMUS..... T	Physiolog. végét. (Orsay).
AMIEL T	Chimie générale.	CASTAING... T	Physique II Thermo (Ors).
HOCART T	Minéralogie et cristallogr.	CURIEN T	Minéral. et cristall.
J.-P. MATHIEU	T Physique (optique).	MOYSE T	Physiol. végét. (Orsay).
COUTEAUX ...	T Cytologie	NOIROT T	Evol. des êtres organisés.
MAY T	Zoologie (Orsay).	PANNETIER ..	T Chimie générale
CHOQUET	T Théor. des fonct. et topol.	POSSOMPES ..	T Zoologie.
FELDMANN ...	T Biologie végét. marine	PULLMANN ...	T Chimie quantique.
GUINIER	T Phys. des solides (Orsay)	TEILLAC	T Phys. nucl. et rad. activit.
JOST T	Physiologie comparée.	TONNELAT... T	T Biolog. physico chim. (Ors)
FORTET T	Calcul des probabilités et physique mathémat.	VILLE T	Econométrie.
SCHWARTZ ...	T Calcul. diff. et intégral.	WILLEMART... T	Chimie (P.C.B.).
CHOUARD ...	T Physiologie végétale.	DODE T	Chimie (Orsay).
MALAVARD ...	T Aviation (Tech. aéronaut.)	FREYMANN ...	T Recherches physiques.
BRELOT T	Calcul différentiel et intégr.	GUINOCHET ..	T Biolog. vég. SPCN (Orsay).
		ROULET.....	T Chimie minérale.

Mlle JOSIEN...	T	Chimie (S.P.C.N.).	J. JULLIEN...	Chimie S.C.N.P. (Orsay).
CHEVALLEY...	T	Geom. alg. et théor. d. gr.	MALGRANGE...	T Tech. math. de la physiq.
ARNOULT...	T	Electronique (Orsay).	OLIVIER...	Anthropologie.
CHAPELLE...	T	Physique I (Orsay).	NOZERAN...	T Botanique II (Orsay).
DELANGE...	T	Mathémat. I (Orsay).	BLANC-	
DENY...	T	Mathémat. gén. (Orsay).	LAPIERRE...	T Physique E.N.S. (Orsay).
GERMAIN...	T	Mécan. théor. des fluides.	CHEVAUGEON...	T Botanique (Orsay).
G. LUCAS...	T	Géologie.	KAHANE...	T Mathématiques (Orsay).
ALLARD...	T	Chimie physique.	SAMUEL...	T Mathémat. (E.N.S. fém.).
BERTHELOT...	T	Phys. des particules fon-	KOURGANOFF...	T Astronomie (Orsay).
		damentales (Orsay).	THIRY...	T Mécanique céleste.
BRICARD...	T	Météorologie et phys. de	ABELES...	Physique SPCN.
		l'atmosphère.	AMAT...	T Physique P.C.B.
			AUBOIN...	T Géologie.
M ^{me} ALBE-			M ^{me} BENOIT-	
FESSARD...	T	Psychophysiologie.	GUEUTAL...	T Physique Nucl. et radio-
FRIEDEL...	T	Phys. des solides (Orsay).		activité. (Orsay).
M. JULIA...	T	Etudes des molécules	BOUGIS...	Biologie marine (Villefran-
		natur. complexes.		che-sur-Mer.
LENDER...	T	Biol.animale (SPCN) (Ors.)	BRUHAT...	T Mathématiques M.P.C.
MAGAT...	T	Physico-chimie des radio-	BRUNN...	T Géologie historique (Orsay)
		éléments.	CHABBAL...	T Physique M.G.P. (Orsay).
M ^{lle} QUINTIN	T	Electrochimie.	DEHEUVELS...	T Mathématique Propé(Ors.).
MONOD...	T	Chimie du métabolisme.	D'ESPAGNAT...	T Phys. théorique (Orsay).
BENOIT...	T	Physiol. anim. (Orsay).	FURON...	T Géologie S.P.C.N.
DE POSSEL...	T	Analyse numérique.	M ^{me} GANS...	T Génétique
CHARLOT...	T	Chimie analytique.	GENEVES...	Biologie végétale P.C.B.
LEMÉE...	T	Ecologie vég. (Orsay).	GUILBERT...	Physique (CUS Orléans).
GUÉRIN...	T	Chimie M.P.C. (Orsay).	HUPE...	T Pétrographie.
M. CHATELET	T	Chimie (P.C.B.).	HOLLANDE...	T Biologie générale.
JEAN...	T	Physique nuclé. (Orsay).	LIONS...	T Analyse numérique.
MATTLER...	T	Physique S.P.C.N.	MAITTE...	T Chimie P.C.B.
BERGERARD...	T	Zoologie (Orsay).	MEYER...	Physique propédeutique.
BERTIN...	T	Electronique (Orsay).	NICOLAS...	Géologie appliquée.
BOUSSIÈRES...	T	Radiochimie.	PANGEL...	Biologie générale.
M ^{me} COUTURE...	T	Therm. et mécan. phys.	RAVIER...	Pétrographie.
ELLENBERGER...	T	Géologie des gr. rég. du gl.	ROSEAU...	T Mécanique théor. des fluid.
FRANC...	T	Biol. animale (P.C.B.).	ROUBINE...	T Electronique.
SCHNEL...	T	Botan. tropicale (Orsay.)	SILBER...	T Chimie P.C.B.
STOLKOWSKI...	T	Physiologie végétale.	UEBERSFELD...	T Electronique.
ACHER...	T	Chimie biol. (Orsay).	YVON...	T Théories physiques
BAUDOIN...	T	Biologie animale P.C.B.	HERVÉ...	T Mathématiques.
BEAUMONT...	T	Biologie animale S.P.C.N.	NÉRON...	T Mathém. M.P.C. (Orsay).
BLAMONT...	T	Géophysique ionosphère.	Mme PECKER-	
BOURREAU...	T	Botanique.	WIMEL...	T Astrophysique.
D. CURIE...	T	Physique (M.G.P.).	BALKANSKY...	Physique M.P.C.
DURAND-DELGA	T	Géologie.	LE CORRE...	T Electricité.
FRÉON...	T	Chimie organ. (Orsay).	DELcroix...	T Physique théor. (Orsay).
HELLER...	T	Physiologie végétale.	GOURDIN...	Phys. théor. des Hautes-
TORTRAT...	T	Calcul des probabilités.		Energies (Orsay).
CAILLEUX...	T	Géologie (S.P.C.N.).	LEHMANN...	T Phys. Exp. des Hautes
MAGNAN...	T	Physique (S.P.C.N.).		Energies (Orsay).
DAUDEL...	T	Mécan. ondul. appliquée à	NATAF...	T Physique nucléaire et
		la chim. théor. et à la		radioactivité (Orsay).
		phys. nucléaire.	ECHALIER...	Biologie animale P.C.B.
M ^{lle} FOURCROY		Biol. végét. (S.P.C.N.).	BARRAUD...	Physiologie cellulaire.
M ^{me} CHOQUET-			LIOTET...	Physiologie végét. Orsay
BRUHAT...	T	Mécan. anal. et mécan. cél.	DARS...	Géologie struc. et géol.
M ^{lle} VEIL...	T	Physiologie générale.		appliquée.
LWOFF...	T	Microbiologie.	CAMEFORT...	T Botanique (aggrégation).
SIESTRUNCK...	T	Mécan. phys. et expérim.	VICHNIEWSKY...	T Mécanique industrielle.
LACOMBE...	T	Mécan. phys. et expérim.	BLAQUIÈRE...	Electronique (Orsay).
BROCHARD...	T	Mécan. phys. et expérim.	ARNOUS...	T Physique théorique.
CABANNES...	T	Mécanique générale.	TATIBOUET...	Chimie (C.S.U. Orléans).
LESTEUR...	T	Mathém. I. (Orsay).	MALLIAVIN...	T Mathémat. propé Orsay
MAZET...	T	Mécaniq. générale (Orsay).	GAUDEMAR...	Chimie Propé.
CAIRE...	T	Géographie phys. et géol.	PEREZ Y JORBA	Phys. Exp. des Hautes
		dynamique.		Energies (Orsay).
COMOLET...	T	Mécanique des fluides.	DAVID...	T Chimie (Agrég. Orsay).
CORABŒUF...	T	Physiologie animale. (Ors)	BROUSSE...	T Mécanique théorique.
DELOUE...	T	Physique de l'exosphère.		
GORENFLOT...	T	Botanique II (Orsay).		
HOUILLO...	T	Biologie animale P.C.B.		

Secrétaire général R. POUILLAIN

TABLES DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
CHAPITRE PREMIER. — CYTOLOGIE, CYTOCHIMIE DES LIPIDES DE <i>LEMANEA NODOSA</i> (KÜTZ.)	19
I. — POSITION TAXONOMIQUE ET CYCLE BIOLOGIQUE DE <i>LEMANEA NODOSA</i>	19
II. — RECHERCHES CYTOLOGIQUES ET CYTOCHIMIQUES.	20
a) OBSERVATIONS ET COLORATIONS ; VITALES, POST-VITALES ; RÉACTIONS DE DISSOLUTION	20
b) FIXATIONS ET COLORATIONS CYTOCHIMIQUES DES LIPIDES.	21
c) RÉSULTATS	21
III. — CONCLUSIONS	24
CHAPITRE II. — RECHERCHES CHIMIQUES	27
I. — LES ALGUES ÉTUDIÉES	27
II. — EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX	28
III. — ADSORPTION DES PIGMENTS LIPOSOLUBLES PAR LE CHARBON ACTIF. CONSÉQUENCES	30
IV. — LA SÉPARATION DES LIPIDES PAR CHROMATO- GRAPHIE SUR COUCHES MINCES	34
V. — PHOSPHORE LIPIDIQUE, PHOSPHORE TOTAL ..	42
VI. — L'ANALYSE DES CONSTITUANTS DÉFINIS DES LI- PIDES D'ALGUES	46
1) L'INSAPONIFIABLE ET LES ACIDES GRAS DE <i>Lemanea nodosa</i> (INDICES CHIMIQUES)	46
2) COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE	48
a) des acides gras totaux.	51
b) des acides gras provenant de fractions lipidiques. ...	53
Discussion.	56
3) SÉPARATION DES ACIDES GRAS LIBRES PAR LES RÉMINES ÉCHANGEUSES D'IONS	60
CHAPITRE III. — RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES	75
I. — VARIATIONS DES ACIDES GRAS TOTAUX SELON LES ESPÈCES.	75
II. — VARIATIONS DES ACIDES GRAS TOTAUX EN FONC- TION DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE (REPRODUCTION)	79
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	83



Digitized by the Internet Archive
in 2026

LES LIPIDES DE QUELQUES RHODOPHYCÉES

(Recherches cytochimiques, chimiques
et physiologiques).

par Mme M.-H. LAUR-HENRY

RÉSUMÉ

Bien que contestée jusqu'alors par les Phycologues et les Cyto-
logistes, la présence de lipides chez les Rhodophycées est ici confirmée.

L'étude histochimique relative à *Lemanea nodosa* permet d'énoncer
les conclusions suivantes :

— il existe des gouttelettes huileuses formées par des glycérides
à l'exclusion de lipides complexes ;

— ces glycérides :

- résultent de l'estérification du glycérol par des acides gras for-
tement insaturés ;

- sont abondantes au niveau des spores assurant la multipli-
cation de l'espèce. Ces réserves sont cependant rares dans les
cellules végétatives ;

- accompagnent un important dépôt d'amidon floridéen au niveau
de ces carpospores.

Après une extraction longue et délicate, l'étude chimique décèle
la présence de deux types de lipides tant chez les algues rouges d'eau
douce que celles d'eau de mer, à savoir :

a) des lipides de constitution, appartenant aux organites et mem-
branes cellulaires : ce sont les glycolipides et les sulfolipides ;

b) des lipides de réserve, triglycérides mixtes, à l'exclusion de
phospholipides.

Pour cette dernière catégorie l'analyse chimique permet d'affirmer
la présence des acides gras suivants : caprique, laurique, myristique,
myristoléique, palmitique (majoritaire), palmiloléique, stéarique (mino-
ritaire), oléique et linoléique, mais peu ou pas de linolénique. Enfin
sont aussi présents des acides gras en C_{20} , possédant de une à quatre
double liaisons. Les acides en C_{22} n'existeraient qu'à l'état de trace (?).

Mais ces lipides de réserve, triglycéridiques, ne se formeraient
chez les différentes espèces étudiées, que dans les organes de multipli-
cation. L'influence de la salinité du milieu de croissance ne paraît pas
être aussi importante que les facteurs liés à l'espèce.

L'originalité du métabolisme des Rhodophytes, déjà révélée par
les glucides est ici accusée par l'étude de leurs lipides de réserve.

REMERCIEMENTS

Je tiens ici, à dire toute ma gratitude à ceux qui m'ont initiée, orientée et aidée au cours de ce travail.

Tout d'abord M. l'Abbé J. AUGIER, professeur de Botanique à l'Université libre de Paris, qui m'a intéressée à la biochimie des sucres des Floridées, tout en m'aidant à récolter soit à Saint-Lô, soit à Ambleteuse les premières algues. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de la reconnaissance et de l'amitié de sa première élève de thèse.

Je ne puis ici, à regret, que témoigner à la mémoire de M. le professeur R. COMBES, toute la déférence et toute la reconnaissance que je lui dois, tant pour sa bienveillance que pour les encouragements qu'il me manifestait il y a seulement quelques mois encore.

Dès 1951, M. le professeur J. FELDMANN, m'offrait son parrainage et j'espère ne pas trop décevoir sa sollicitude en le priant d'accepter ce travail. Qu'il veuille bien partager avec Mme G. FELDMANN, mon témoignage reconnaissant pour l'aide amicale et l'accueil qu'ils m'ont ménagés dans leur nouveau laboratoire en juillet 1961.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à M. le professeur M. CHADEFAUD, dont l'appui me permit, en 1955, de mener à bien les premières recherches histochimiques.

A M. le professeur P. CHOUARD, dont le dynamisme me fut un exemple, et dont l'aide contribua efficacement à l'orientation de cette thèse, j'adresse ici mes vifs remerciements.

De M. C. PAQUOT, Directeur du Laboratoire de Lipochimie au Centre National de la Recherche Scientifique, je sollicite l'indulgence pour les résultats quelque peu surannés portés dans ce travail, et je n'ai garde d'oublier l'aide constructive et si patiente dont cette rédaction porte la marque. Qu'il veuille bien accepter, et partager avec le personnel de son Laboratoire, mon témoignage de très cordiale gratitude.

Que M. le professeur A. EICHHORN, président de ce Jury, et bien au-delà de cette charge, soit assuré de ma bien vive reconnaissance.

Je ne saurais oublier :

M. DAVY DE VIRVILLE,

M. le professeur G. TESSIER,

M. et Mme F. MAGNE

auxquels je suis particulièrement redevable de tant d'avantages matériels ou de conseils utiles et précieux, largement prodigués, au cours de la réalisation pratique de cette thèse.

Que tous ceux et celles, ils sont nombreux, qui m'ont aidée et encouragée, à des titres divers, trouvent ici le témoignage de mon amitié et de ma reconnaissance.

INTRODUCTION

Actuellement, Cryptogames au sens strict et végétaux vasculaires sont si dissemblables que pour leur classification, les auteurs utilisent des caractères tout différents. Pour les premiers ce sont les données déterminantes de la cytologie, de la cytochimie et de la biochimie (M. CHADEFAUD 1960, J. FELDMANN 1958 et 1963). Pour les seconds, les Systématiciens font appel à d'autres critères : morphologie, anatomie, mode de reproduction, etc... En outre, si nous admettons que les algues constituent la majorité des végétaux aquatiques, des eaux douces et surtout des eaux marines, il faut noter qu'elles composent des embranchements fort divergents. N'y a-t-il pas plus de similitude dans le fonctionnement du plaste d'une Chlorelle et celui d'une cellule de Dicotylédone, qu'entre ces mêmes organites et le rhodoplaste d'une algue rouge? (cf. J. FELDMANN, 1958).

Donc, même parmi les Algues, les Rhodophycophytes sont reconnues, depuis longtemps, comme formant un groupe bien particulier aux espèces morphologiquement très différentes.

Dès 1843 J.T. KÜTZING observait déjà la présence d'un amidon spécial, nommé floridéen plus récemment, auquel G. MANGENOT, en 1921, attribuait une origine intracytoplasmique et une localisation périnucléaire préférentielle, dans les carpospores de *Lemanea*. L'auteur soulignait alors que ces faits opposaient cette substance à l'amidon intraplastidial des Phanérogames, des Cryptogames et même des Chlorophycophytes.

Mais ce sont les biochimistes qui isolèrent des glucides solubles caractéristiques de ces algues rouges tels que les hétérosides du glycérol (COLIN 1930 et coll., AUGIER, LINDBERGH, etc...) et aussi des alcools polyhydroxylés. En 1931 E. GUÉGUEN remarquait la présence exclusive de floridoside chez *Rhodymenia palmata*, où l'amidon floridéen restait strictement localisé dans les tétraspores. Ce même auteur, en 1936, indiquait dans *Furcellaria fastigiata* une accumulation estivale et parallèle d'amidon et de floridoside, ces deux glucides disparaissant ensemble et progressivement au cours de l'hiver suivant. Mais nous ne savons pas si les échantillons analysés portaient ou non des organes reproducteurs, ou des spores. La répartition des glucides solubles et insolubles, eu égard au déve-

loppement physiologique était déjà un problème à étudier chez d'autres Floridées.

D'autre part et plus récemment, BIDWELL (1958) prouvait que les premiers produits élaborés, par photosynthèse en atmosphère enrichie par $C^{14}O_2$ étaient :

- invariablement du floridoside pour *Rhodymenia palmata*, *Chondrus crispus*, *Corallina officinalis*.
- du floridoside, plus mannitol pour : *Halosaccion ramellaceum*
- et seulement du mannoglycérate de sodium chez *Polysiphonia lanosa*.
- uniquement le mannitol pour les algues brunes ;
- le saccharose pour les algues vertes.

Il y avait cependant une homogénéité remarquable, pour les trois types d'algues, quant aux produits radio-actifs synthétisés, mais éthanol-insolubles.

Amidon floridéen, hétérosides du glycérol éthanol solubles, voilà des substances chimiquement définies, prouvant que la cellule des Rhodophycées utilise tout différemment l'énergie lumineuse. Qu'en est-il des lipides, autre forme d'accumulation de métabolites cellulaires ?

Chez les plantes vasculaires, la présence de gouttelettes lipidiques est fréquente dans les cellules végétatives, mais elles ne se déposent abondamment que dans certains organes : graine, péricarpe des fruits, plus rarement dans les tiges et les rhizomes. Selon R. COMBES (1946) : « le pouvoir d'accumulation des lipides est surtout répandu chez les espèces vivant dans les régions tropicales et subtropicales ; il y a cependant des espèces de climats tempérés et de climats froids »... De plus « l'accumulation lipidique en acides gras saturés est d'autant plus grande que la température ambiante est plus élevée ». R. DUPÉRON (1954) signale qu'« il semble y avoir dans les tissus de la graine (oléagineuse) une sorte d'incompatibilité entre la présence d'amidon et celle des graisses ». Enfin une statistique récente (SCHARAPOV 1958) indique que le tiers seulement des espèces du monde végétal, possède huile ou graisse en tant que réserve.

Pour les algues et surtout en ce qui concerne les Rhodophycées les données sont limitées :

Si G. MANGENOT en 1922 révèle la présence de lipides au niveau des chromatophores et dans le cytoplasme de Vauchérie (Xanthophycées), il accuse les Floridées étudiées, dont les *Lemaneacées*, d'une remarquable pauvreté en inclusions osmiophiles. Cependant en 1940, M. CELAN, affirme que synapses, tractus cytoplasmique de cellules axiales, cytoplasme des cellules placentaires décèlent microchimiquement des lipides, de nature différente toutefois. La

même année G. FELDMANN montre que dans certaines conditions « le cytoplasme de *Wrangelia penicillata*, peut être bourré de fines granulations osmiophiles — non soudanophiles — au point même de donner à l'algue tout entière un aspect blanchâtre très particulier ». Phycologues et Cytologistes paraissent donc être d'accord pour dire que, si chez beaucoup de Chromophytes les glycérides constituent le premier produit visible de la photosynthèse, il n'en est pas de même chez les Rhodophytes — J. et G. FELDMANN en 1945 peuvent alors conclure que « le glycérol provenant soit de l'activité directe de la photosynthèse..., soit d'une transformation des glucides, s'y accumule chez les Rhodophycées sous une forme différente ».

L'absence de glycérides — soudanophiles, s'explique-t-elle par l'abondance d'hétérosides solubles du glycérol : floridoside, isofloridoside, mannoside du floridoside et mannoglycérate de sodium? Ou bien alors existe-t-il, chez les Rhodophycées, des substances lipidiques à caractères différents des glycérides neutres et non décelables à l'observation vitale?

C'est de la convergence de ces faits que prit naissance l'étude ci-après développée, tout en précisant que si l'isolement des graines ou des fruits est fréquemment possible chez les végétaux supérieurs, l'étude chimique des lipides a été effectuée, dans le cas des algues, sur les plantes entières.

Mais au-delà du problème des glycérides de réserves, nous savons aujourd'hui qu'il existe d'autres lipides, souvent plus abondants que les premiers, car directement liés au métabolisme cellulaire. Ils jouent dans les plastes un rôle primordial lors de la photosynthèse, et font partie intégrante des membranes cellulaires (BENSON 1964).

H.E. CARTER en 1956, et ses collaborateurs, montrent la présence de deux lipohydrates de carbone, glycéridiques, dans une farine de blé blanchie. L'un plus soluble dans l'acétone (substance A) donne après saponification un β -D-galactosyl-1-glycérol. L'autre (B) moins soluble dans l'acétone, par le même procédé, fournit l' α -D-galactopyranosyl-1, 6- β -D-galactopyranosyl-1-glycérol. Ils ont pour formule respective :

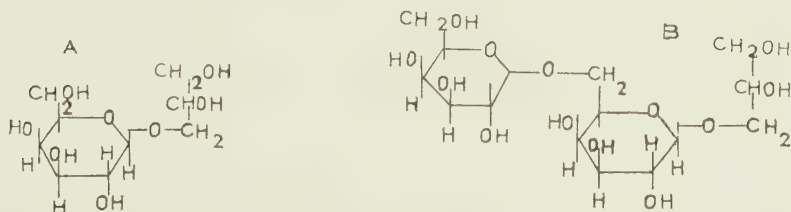


Fig. 1. — β -D-galactopyranosyl-1-glycérol. (A)
 α -D-galactopyranosyl-1,6- β -D-galactopyranosyl-1-glycérol. (B)

A.A. BENSON et ses collaborateurs, utilisant des méthodes radiochromatographiques, indiquent en 1959 que, non seulement les galactolipides, mais encore des phospholipides et des sulfolipides sont concentrés au niveau des chloroplastes (Epinard) ou des chromatophores bactériens (*Rhodospirillum rubrum*). La fraction prédominante de ces lipides complexes est constituée de galactolipides. Puis R.A. FERRARI (1959), élève de BENSON, démontre que *Chlorella pyrenoidosa*, croissant en présence de $C^{14}O_2$ (expositions de 15 secondes à 6 h.), synthétise les lipides suivants, classés dans l'ordre de leur importance et selon la vitesse de leur biosynthèse :

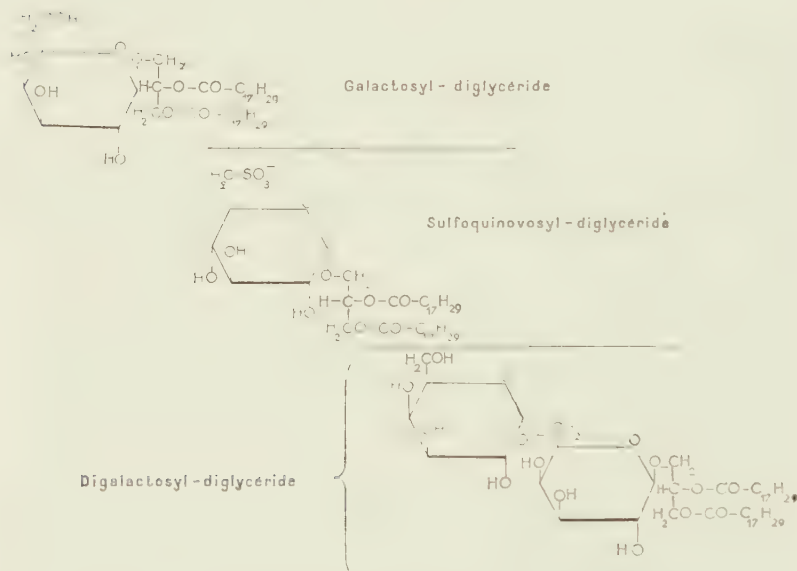


Fig. 2. — Glycolipides des algues : cf. A. A. BENSON (1963).

galactosyl monoglycérider
digalactosyl monoglycérider
phosphatidyl glycérider
galactose sulfate monoglycérider
phosphatidyl inositol
Lécithine

phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine.

De plus le marquage du galactose, dans les glycolipides est beaucoup plus rapide que celui des parties acides gras ou glycérider ; celui des triglycérider est très lent.

Mais c'est un autre élève de BENSON, ISAO SHIBUYA qui eut le mérite de mettre en évidence chez diverses algues, les mono, digalactosyl glycérides et les sulfolipides, tous trois prédominants dans les espèces suivantes :

RHODOPHYCÉES :

- 1) marines : *Agardhiella tenera* (septembre) ;
Ceramium rubrum (août) ;
Iridaea laminarioides (décembre) ;
Polysiphonia harveyi (septembre) ;
Porphyra umbilicalis (août-septembre).
- 2) d'eau douce : *Porphyridium cruentum* (cultivé en milieu salé).

CHLOROPHYCÉES

- 1) marine : *Ulva lactuca* (septembre).
- 2) d'eau douce : *Scenedesmus* D₃, *Chlorella pyrenoidosa* (cultivés en laboratoire).

A cet auteur revient encore d'avoir su prouver qu'aucune relation ne semblait exister pour les Rhodophycées, entre hétérosides et galactolipides. Pour BENSON et SHIBUYA (1962) il semble bien que « la configuration en α des galacto-glycérides limite leur diffusion à travers les lipides des membranes cellulaires, liés en β ».

Galactolipides et sulfolipides ont encore été trouvés, puis étudiés par R.O. WEENINK dans les feuilles de *Trifolium pratense*, où ils constituent plus de 60 % des lipides totaux ; par KATES dans les feuilles du haricot grimpant et sans doute par bien d'autres auteurs.

Tout récemment, G. GIRAUD, dans les chloroplastes vivants de Rhodophycées : *Rhodomela subfusca*, *Rhodosurus marinus*, signale qu'après réaction de Molisch « un précipité d'argent se forme au niveau des lamelles plastidiales et sur toute leur surface, à l'endroit même où se localise la Chlorophylle, tandis que pour les algues témoins, placées à l'obscurité, les molécules d'argent se déposent à l'extérieur du plaste,... dans la membrane cellulaire ».

Or, pour BENSON, les glycolipides d'une part, dits encore lipides de surface active, sont liés à la chlorophylle et adsorbés aux interfaces dans la séquence protéine-lipide-pigment. D'autre part, le marquage rapide de leur molécule de galactose indique que ces lipides sont en contact avec la phase aqueuse, contenant les enzymes de la synthèse glucidique. Enfin, et toujours selon BENSON, les chaînes acides gras des glycolipides, moins bien orientées, doivent être considérées comme faisant partie de la phase liquide. Que sont donc les acides gras des glycolipides, et par extension des plastes, des membranes cellulaires ? Récemment, identifiés par chromatographie en phase gazeuse, H.E. CARTER en donne la liste reportée au Tableau I ci-dessous :

TABLEAU I

Esters méthyliques des acides gras des lipides galactosyl glycérol, obtenus à partir de la farine de blé non blanchie. H. E. CARTER (1961)		
Acide gras correspondant	Composition %	
	Monogalacto- sylglycérol	Digalacto- sylglycérol
Myristique C ₁₁	0,5	
Palmitique C ₁₆	13,9	41,6
Palmitoléique C _{16 1 -}	3,4	
Stéarique C ₁₈	1,3	4,4
Oléique C _{18 1 -}	17,2	12,1
Linoléique C _{18 2 -}	57,0	29,3
Linolénique C _{18 3 -}	2,0	
Autres acides	5,1	12,6

Ces valeurs peuvent être erronées dans une proportion relative de $\pm 15\%$

Pour WEENINK les acides gras des galactolipides du trèfle sont formés :

pour 95,8 % d'acide linolénique

1,9 % d'acide linoléique

2,3 % d'acide palmitique.

H. DEBUCH à partir des chloroplastes isolés de plusieurs espèces de Phanérogames donne les résultats consignés au Tableau II :

TABLEAU II

Acides gras des chloroplastes isolés de plantes supérieures, en % des acides gras totaux									
Origine	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C _{16 1 -}	C _{16 3 -}	C ₁₈	C _{18 1 -}	C _{18 2 -}	C _{18 3 -}
Épinard S	0,4	0,5	17,8	3,8	11,5	1,0	5,4	10,8	48,8
<i>Spinacia oleracea</i>									
Épinard D	0,5	1,3	15,5	5,8	19,5	1,5	3,1	5,0	47,8
<i>Anthirrhinum majus</i>	-	trace	9,5	1,3	0,2	1,0	1,6	15,1	71,3
variété prasinizans	0,7	trace	13,8	2,4	-	1,6	1,9	15,0	64,6
<i>Allium Porrum</i>	0,4	trace	19,7	2,1	-	1,0	3,5	29,2	44,1

Enfin tout récemment (1964) O'BRIEN et BENSON publient des valeurs pour *Chlorella pyrenoidosa* concernant les acides gras, estérifiés par trois glycolipides et rapportées au tableau suivant :

TABLEAU III

Acides gras des glycolipides de *Chlorella pyrenoidosa* (O'BRIEN et BENSON 1964)

Glycolipides	Nombre d'atomes de carbone des acides gras										
	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₆ =	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₈ 1=	C ₁₈ 2=	C ₁₈ 3=	C ₁₉	C ₁₈ 4=
Sulfo-quinovopyranosyl-diglycérade	tr	tr	67,5	1,6	—	0,4	18,3	2,0	9,8	—	0,8
Galactosyl-diglycérade	tr	tr	2,7	9,7	1,5	0,3	40,5	4,5	26,8	12,0	2,6
Digalactosyl-diglycérade	tr	tr*	11,6	9,5	1,2	0,4	36,8	5,8	27,0	3,3	3,3

De l'ensemble de ces travaux on peut déduire que pour les plantes supérieures, les acides gras des glycolipides sont surtout représentés par les di-(blé) et triènes en C₁₈ (trèfle, épinard, gueule de loup, luzerne (O'BRIEN), un C₁₆ triéthylénique est signalé (DEBUCH) — Pour *Chlorella*, sulfo et galactolipides ont des compositions bien différentes. Le sulfo-quinovopyranosyl-diglycérade contient en proportions décroissantes les acides suivants : palmitique, oléique, linoléique. Dans le même ordre et pour les deux galactosyl-diglycérades ce sont les acides : oléique, linoléique, palmitolique, enfin palmitique. Malgré le petit nombre d'analyses relatives aux glycolipides des algues, on remarquera qu'aucun auteur ne signale la présence d'acides gras saturés ou non, en C₂₀ et au-delà.

Que sait-on alors des acides gras des algues en général?

SCHLENK et coll. (1960) trouvent dans une culture âgée de *Chlorelles* 14 % d'acide linoléique ; mais pour des cultures jeunes 90 % d'acides insaturés.

J.D.A. MILLER (1962) pour cette même algue indique : de faibles teneurs en acides gras C₁₆ et C₁₈ saturés, prépondérance de di et triènes C₁₆ et C₁₈, des variations étonnantes de ces teneurs suivant les conditions de culture, tout spécialement vis-à-vis de l'apport en azote.

Des acides gras en C₂₀, mais à l'état de trace, seraient présents chez une Xanthophycée : *Monodus subterraneus*. Un acide gras ramifié est mentionné aussi par SCHLENK. Enfin ces acides gras se

répartissent comme suit : 60 % appartiennent à des triglycérides, 30 % à des mono ou des diglycérides, 9,2 % seulement des acides gras sont libres chez *Monodus subterraneus* (rapporté par MILLER).

Pour les Rhodophycées, seule l'analyse en 1936 de J.A. LOVERN présente une certaine importance, car l'auteur signale en effet que chez *Rhodymenia palmata*, 75 % des acides gras totaux sont insaturés et parmi ceux-ci 20 % sont des tri et des tétraènes en C₁₈, 36 % des tétra et pentaènes en C₂₀, et pour C₂₂ 13 %, sans autre précision.

D'autres auteurs veulent, à la suite de J.A. LOVERN, trouver dans le phytoplancton la source des acides gras polyéthyléniques bien connus dans les graisses de réserve des poissons. KELLY, RAISER et HOOD pensent que ces animaux ne peuvent accumuler de tels acides gras, qu'à partir d'acides gras mono, di ou triéthyléniques, essentiels ou non, fournis par le phytoplancton. De ce point de vue, les graisses des algues, si elles sont désaturées, joueraient un rôle biologique de tout premier ordre.

Voici donc quelques faits établis aujourd'hui, tributaires certes des méthodes d'analyses. Le développement rapide de celles-ci au cours de la dernière décade permet maintenant d'élargir l'étude des lipides et par là, nos connaissances dans un domaine jusque-là réservé à l'industrie.

Pour notre part nous avons essayé de démontrer qu'il existe chez les Rhodophycées des lipides, d'en étudier la composition et leurs variations. Tout d'abord par les méthodes histochimiques classiques, ce qui constituera le chapitre premier. Puis par les techniques chimiques, objet du second chapitre. Enfin après l'étude des variations physiologiques des acides gras, termes de l'analyse chimique, nous concluons en essayant de montrer qu'il reste encore beaucoup à faire pour connaître les lipides des algues, cueillies dans leur milieu naturel. Les espèces cultivées en laboratoire, de type unicellulaire, étant par là même considérées comme mieux étudiées, par nos contemporains.

CHAPITRE PREMIER

CYTOLOGIE ET CYTOCHIMIE DES LIPIDES

DE *LEMANEA NODOSA* (KÜTZ)

I. — POSITION TAXONOMIQUE ET CYCLE BIOLOGIQUE DE *LEMANEA NODOSA* (KÜTZ)

Il nous paraît indispensable de préciser tout d'abord que ce terme de *nodosa*, donné à l'espèce du *Lemanea* étudié, n'est conservé ici qu'en raison du fait que P. FREMY, éminent algologue, l'avait ainsi déterminé à Saint-Lô, sur les lieux mêmes de nos récoltes.

Cependant, si nous nous appuyons sur la classification donnée par SIRODOT, dont les critères de détermination reposent essentiellement, pour les LEMANEACÉES sur :

l'aspect et le mode de ramification du Chantransia,
l'origine des filaments reproducteurs, à partir du Chantransia,
la largeur et la configuration de l'anneau, dessiné aux nœuds, par les spermatocystes.

nous conviendrons avec M.C. NOAILLES, que l'espèce utilisée au cours de ce travail est très probablement *Lemanea catenata*.

Dans cette équivoque et afin de limiter au maximum les erreurs qui pourraient en découler, les différents gisements de *Lemanea* furent nettement localisés, et en fonction de ces repères, nos récoltes ont été minutieusement numérotées. Ces dernières concernent donc un *Lemanea nodosa*, dont la morphologie est si proche de celle de *Lemanea catenata* que ces deux espèces seront ici confondues.

Egalement à la suite de SIRODOT, nous dirons que l'appareil végétatif des Lemaneacées est constitué, d'abord par le Chantransia. Fixé au substrat par des rhizoïdes, il porte, mêlées à ces derniers, de grosses cellules proembryoniformes et d'autre part des filaments dressés, de structure cellulaire pouvant atteindre une hauteur maximum d'environ 7 mm. Ce Chantransia est pérennant.

C'est à partir de ce minuscule feutrage, que s'érigent les filaments reproducteurs, tubuleux ou *Lemanea* au sens strict. Ces

organes comportent, au-dessous de la région apicale de croissance deux régions bien distinctes : le cortex constitué par trois couches de cellules de plus en plus grandes et de moins en moins pigmentées au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la périphérie. Enfin, au centre, le filament axial et les rhizoïdes internes, sont presque incolores.

Au cours de leur croissance, les filaments reproducteurs, vert olivâtre, se garnissent de « nœuds » à peu près équidistants, formés par les zones à spermatocystes, tandis que les organes femelles se différencient tout le long des entrenœuds, et à partir des cellules corticales internes ; leur trichogyne émerge alors à la surface externe du cortex. Après fécondation du carpogone, une prolifération cellulaire importante donne naissance aux gonimoblastes dont chaque élément, à son tour, se différencie en carpospore. En juillet-août, les carpospores mûres seront alors libérées par émiettement du thalle ou filament reproducteur, dont il ne restera plus trace sur le *Chantransia*.

II. - RECHERCHES CYTOLOGIQUES ET CYTOCHIMIQUES

Les travaux cytologiques concernant les *Lemaneacées* sont pour la plupart déjà anciens et signalés dans l'ouvrage de FRITSCH, et la thèse de MULLAHY. L'étude plus récente de M.C. NOAILLES se rapporte aux facteurs écologiques, phytosociologiques et à l'environnement physico-chimique, caractéristiques de ces *Rhodophytes* d'eau douce. Nous y trouvons de plus leur étude morphologique complète et très précise.

Nos recherches portant plus spécialement sur les lipides de réserve, ont été menées selon les deux voies complémentaires classiques :

- a) l'observation et les colorations vitales, postvitales et les réactions de dissolution ;
- b) l'observation comparée après fixations et colorations cytochimiques.

a) OBSERVATION ET COLORATIONS VITALES, POSTVITALES, EFFET DES SOLVANTS.

L'algue coupée à la main est montée alors dans une goutte d'eau distillée, ou permutée à 1 pour 1 000 de rouge neutre. L'eau du robinet étant trop alcaline à Paris, on évitera de l'utiliser.

Les solutions diluées de bleu de crésyle, de vert Janus ont été plus rarement employées, leurs teintes n'étant pas assez différentes de celle des cellules de *Lemanea*, en particulier des cellules corticales externes. Les solutions de rouge de ruthénium, révèlent les substances pectiques de la membrane.

Le plus utilisé fut le réactif iodo-ioduré ou Lugol, à des concentrations très faibles. Puis les solutions alcooliques de bleu B.Z.L., rouge soudan VIIIB, noir soudan, ont servi à la mise en évidence des gouttelettes lipidiques du cytoplasme après lavage rapide des coupes fraîches, imprégnées d'eau, par l'alcool 70°.

Enfin les solvants usuels, éther sulfurique, tétrachlorure de carbone, chloroforme, pyridine, acétone, alcools de titres divers (éthanol 70 à 100 %) ne sont pas très actifs même à chaud. Tandis que leurs mélanges, chauffés, dissolvent efficacement les inclusions lipidiques.

b) FIXATIONS ET COLORATIONS CYTOCHIMIQUES

Pour la recherche stricte des lipides le nombre des fixateurs est réduit :

- à l'eau formolée 3 % (formol neutre, 30 % : 10 ml dans 90 ml d'eau distillée) ;
- au fixateur de BAKER (eau formolée contenant 1 % de chlorure de calcium, neutralisée par le carbonate de calcium).
- aux solutions d'acide osmique : fixateurs de MEVES, de CHAMPY, dont on trouvera les formules dans les traités généraux de LANGERON, de LISON, et les ouvrages plus récents d'Histochimie. Il faut mentionner cependant qu'une bonne fixation n'est obtenue qu'à condition d'y placer des échantillons dont la taille est réduite à quelques millimètres.

Les autres fixateurs classiques : HELLY, REGAUD, KARPECHENKO, ont servi à la connaissance des autres constituants cellulaires : plastes, chondriome, noyau. Les fixateurs de BOUIN, BOUIN-ALLEN, GENDRE, PASTEELS, etc., furent nécessaires pour la recherche des glucides (amidon floridéen) antérieurement aux réactions acide-périodique-SCHIFF (P.A.S.), Mac MANUS, BAUER, etc...

Il est également évident que pour l'étude des lipides, l'enrobage à la paraffine est déconseillé : pour la recherche des enclaves lipidiques les coupes seront faites à la main ou mieux au microtome à congélation.

c) LES RÉSULTATS

Observations sur le matériel vivant (voir fig. 3).

Les algues récoltées en mars-avril présentent pour les deux types de cellules végétatives : corticales et axiales, des vacuoles, roses avec les solutions de rouge neutre, contenant des inclusions mobiles arrondies (*f*), colorées totalement ou partiellement en rouge vif. Seules les parties colorées (*f'*) présentent, fréquemment

en lumière polarisée le phénomène de la croix noire. Tandis que pour les jeunes cellules du gonimoblaste, on retrouve des images analogues, cependant plus rares et de très petites vacuoles.

En mai-juin et juillet, cellules corticales et axiales conservent le même aspect. Dans les carposporocystes nous ne trouvons pas trace de vacuole périphérique, mais une masse centrale verte, diffuse dans laquelle on ne peut guère distinguer ni plastes, ni

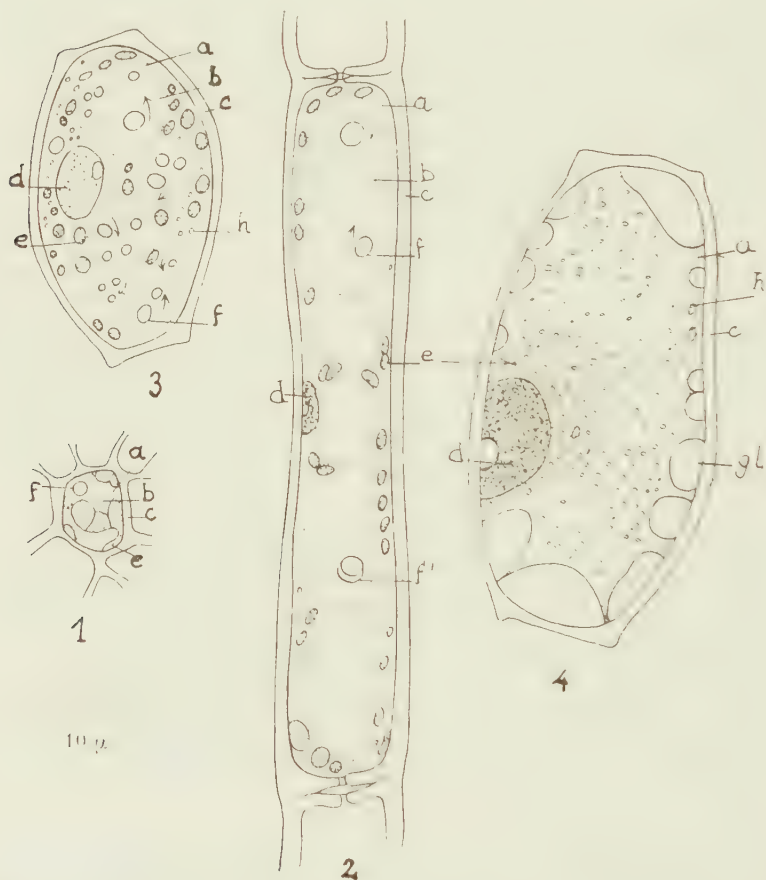


Fig. 3. — 1. Cellule externe du cortex, vue de face. — 2. Cellule axiale. — 3. Très jeune carposporocyste (mai) $20 \times 30 \mu$, à très nombreuses vacuoles. 4. Carposporocyste mûre (juillet) $25 \times 45 \mu$, à zone périnucléaire dense. 1-2-3. Coloration vitale au rouge neutre ; 4. coloration post-vitale : lugol dilué. a) cytoplasme ; b) vacuole ; c) membrane ; d) noyau ; e) plastes ; f) inclusion vacuolaire, mobile souvent colorée (f') par le rouge neutre ; gl) gouttelettes huileuse ; h) amidon.

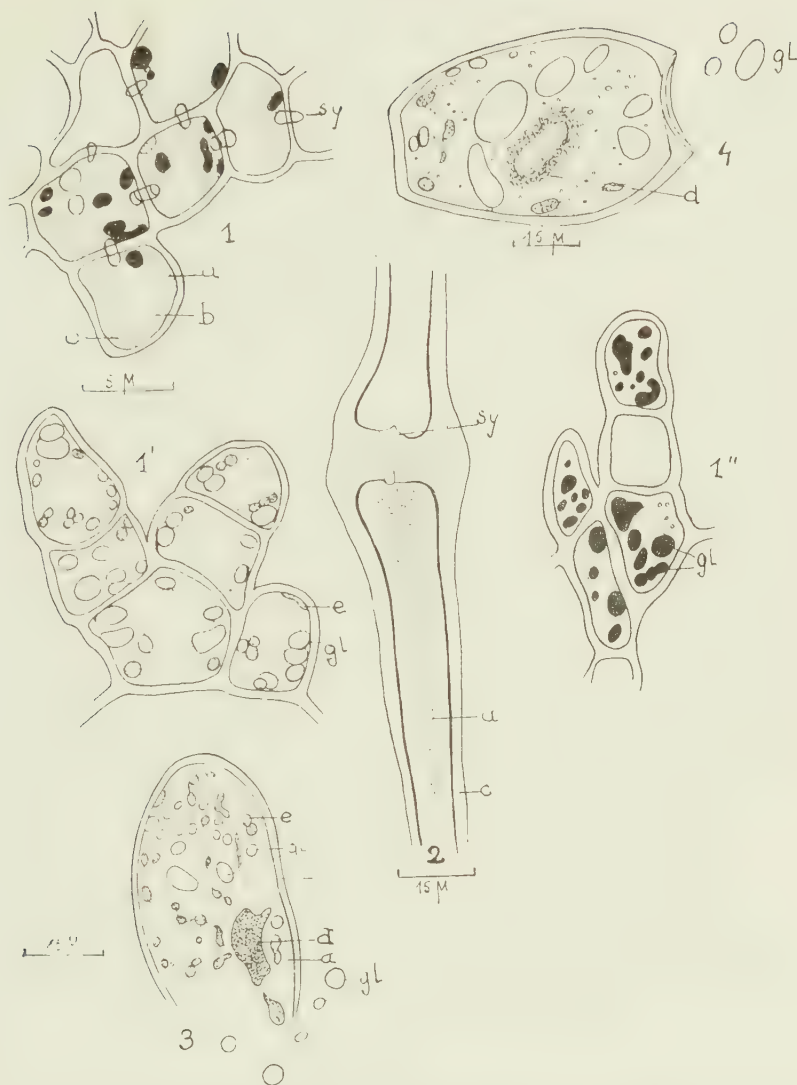


Fig. 4. — 1-1'-1'', Cellules du gominoblaste (mars-avril) fixation au formol-calcium de Baker : 1. Coloration des peroxydes- O_2 Schiff (coloration de fond au vert Lumière) ; 1' Coloration au rouge Soudan ; 1'' Coloration au Nadi.

2. Cellule axiale : fixation et coloration plasmale de Verne.

3. Carposporocyste jeune (mai) : fixation au formol-calcium de Baker. Colorations : hématoxyline, puis rouge Soudan (24 h).

4. Carposporocyste mûre (juillet) sectionnée : fixation au formol-calcium de Baker et coloration de Lorrain-Smith au bleu de Nil (plastides et noyau, bleus ; gouttelettes huileuses, rouges).

a) cytoplasme ; b) vacuole ; c) membrane avec sy : synapses ; d) noyau ; e) plastides ; gl) gouttelettes huileuses. — (Sur les dessins : toutes les enclaves cytoplasmiques ne sont pas représentées ainsi que les synapses).

noyau. Tandis que les carposporocystes mûres de juillet permettent d'observer, appuyées contre la membrane, d'énormes inclusions brillantes, incolores ou souvent jaune pâle.

En avril les solutions d'iode (Lugol) colorent vivement l'algue fraîche. Dans les cellules axiales, corticales et du gonimoblaste l'amidon se présente sous les deux formes : figurée, en masses arrondies ou bien dans les vacuoles ou le cytoplasme sous « l'aspect glycogénique ». Si on prend soin d'utiliser des solutions de Lugol très diluées, les carposporocystes en juillet révèlent alors les globules pariétaux, très visibles, par leur coloration jaune, se détachant du fond brun acajou.

Si aux coupes précédemment colorées par le Lugol on ajoute, quelques gouttes de bleu B.Z.L., ou d'une solution de NADI , les globules cytoplasmiques se colorent rapidement en bleu donnant ainsi une première caractérisation quant à leur nature lipidique.

Dans les cellules du *Chantransia* on remarquera, au niveau des chromatophores, après action des solutions bleu B Z L et NADI la formation de petits précipités colorés, ainsi d'ailleurs que dans les cellules corticales et axiales des filaments reproducteurs (fig. 3).

Après fixation à l'eau formolée (voir fig. 4) :

— la réaction de MAYER positive tend à faire admettre que les inclusions vacuolaires seraient des corpuscules métachromatiques.

— Les colorations plus nettes et positives, aux bleus, de nil, de méthylène, BZL, de NADI , O_2 -SCHIFF, rouge et noir soudan, les réactions négatives de SMITH-DIETRICH, du test de BAKER (sans oublier son témoin) confirment :

a) l'absence de phospholipides ;

b) la nature glycéridique des inclusions cytoplasmiques, dont le caractère insaturé est particulièrement mis en évidence par les tests de NADI , O_2 -SCHIFF, et bleu de Nil (fig. 4).

La fixation osmique a fourni des résultats parallèles.

III. - CONCLUSIONS

L'application aux cellules de *Lemanea nodosa*, végétatives et de multiplication, des nombreux tests histochimiques, établit de façon incontestable qu'il existe bien des lipides chez les Rhodophycées. Ces résultats, appuyés par les recherches de F. MAGNE à propos des tétra- et carpospores de Rhodophycées marines, généralisent donc la présence de lipides de réserves, de type particulier certes, spécialement au niveau des spores de ces algues.

La difficulté de leur observation sur le vivant, est levée par l'usage de la centrifugation.

Outre l'absence de phospholipides de réserve (présents cependant au niveau des plastes et des synapses), on peut encore affirmer que dans les carposporocystes les sucres solubles, le glycogène ou amidon floridéen s'accumulent parallèlement aux matières lipidiques.

Il ne s'agirait donc pas d'une transformation du glycérol glucidique en glycérol lipidique, mais d'au moins deux utilisations simultanées de ce triolcool.

TABLEAU IV

ESPECES	ORDRE et FAMILLE	Date et lieu de récolte	Glycides solubles	Etat physiologique
<i>Lemaneā nodosa</i>	NÉMALIONALES Lemaneacées	de mars à juillet St-Lô (Manche)	Tréhalose Floridoside	Filaments reproducteurs de la fécondation aux carpospores mûres
<i>Sacheria lucina</i>	NÉMALIONALES Lemaneacées	Avril St-Lô (Manche)	Tréhalose Floridoside	Gonimoblastes très rares
<i>Gelidium sesquipedale</i>	GELIDIALES Gélidiaées	Septembre Biarritz	Floridoside seul	Sterile
<i>Furcellaria fastigiata</i>	GIGARTINALES Furcellariacées	Février-avril Roscoff	Floridoside seul	Spermatocystes, tetra- spores ou stérile
<i>Rhododymenia palmata</i>	RHODYMENIALES Rhodymeniacees	Février Roscoff	Floridoside seul	Spermatocystes, tetra- spores ou stérile
<i>Bornetia secundiflora</i>	CERAMIALES Ceramiales	Septembre Biarritz	Inconnu	Avant la formation de gonimoblastes
<i>Polysiphonia elongata</i>	CERAMIALES Rhodomélacées	Février Roscoff	Mannoglycérol de sodium	Sterile

CHAPITRE II

RECHERCHES CHIMIQUES

I. — LES ALGUES ÉTUDIÉES. DÉTERMINATION DES POIDS SECS.

1) Les algues analysées au cours de ce travail, sont toutes des Rhodophycées, Floridées, appartenant à différents ordres ou familles, choisies spécialement eu égard à la nature de leurs glucides solubles. Le Tableau IV, ci-contre, mentionne outre ce caractère biochimique, l'état physiologique, les dates et lieux de récoltes de ces espèces.

Après la récolte, qui pour certaines espèces marines (*Bornetia*, *Polysiphonia*) ne peut avoir lieu qu'au moment des très basses mers, les algues lavées à l'eau de mer courante, triées, sont alors soigneusement séchées, afin d'ôter l'eau superficielle ; pesées rapidement, placées en flacons bruns ou opaques, puis recouvertes d'éthanol absolu ou 96 %, distillés au préalable. Ces flacons sont alors conservés à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'extraction.

2) Détermination des poids secs

Pour les algues marines, les lots d'algues fraîches destinés aux poids secs, représentent quelques centaines de grammes, pour les algues d'eau douce, filamenteuses et beaucoup plus grêles que les précédentes, des quantités limitées à 100 grammes ont été jugées suffisantes.

Leur dessiccation à l'air est très rapide, surtout en été ; en hiver nous utilisons, soit un courant d'air, soit si possible, un courant d'azote, légèrement chauffés.

Le poids sec, correspondant au lot frais, est obtenu par passage à l'étuve 105 °C jusqu'à stabilisation. Les pesées seront menées le plus rapidement possible en raison de l'hygroscopicité des poudres.

Le Tableau V porte indication des poids secs rapportés à 100 grammes d'algues fraîches.

On remarque que l'augmentation de poids est fonction de l'état physiologique ; la période de reproduction : formation de sperma-

locystes, de gonimoblastes, de carpospores et de tétraspores accusent une montée sensible des poids secs.

TABLEAU V

Espèces	Dat. de récolte		Poids sec pour 100 g d'algues fraîches
<i>Lemanea nodosa</i>	19 mars	Gamètes	7,57
	6 avril	Gonimoblastes	8,21
	1 ^{er} juin	Carposporocystes	20,12
	9 juillet	Carpospores mûres	26,86
<i>Furcellaria fastigiata</i>	11 avril	Tétraspores	18,44
	12 avril	Stérile	11,79
<i>Rhodymenia palmata</i>	7 février	Stérile	10,38
	3 février	Tétraspores	10,89
	4 février	Spermatocystes	11,31
<i>Polysiphonia elongata</i>	9 février	Stérile	11,49

II. — L'EXTRACTION DES LIPIDES

Tandis que l'alcool de fixation, recueilli par filtration, est mis à distiller, les algues pulvérisées sont épuisées par lixiviations à l'éthanol 96 % chaud, dans l'appareil de Kumagawa. Pulvérisations et épuisements alcooliques se succèdent jusqu'à ce que la solution éthanolique d'extraction devienne incolore, selon les données de M. W. MILNER. Nous avons vérifié que les épuisements par d'autres solvants purs, ou en mélange, recommandés principalement par DELSAL, n'entraînaient pas mieux les lipides algaux, tout au moins dans le cas de *Lemanea*.

Les résidus fournis par évaporation des alcools de fixation et d'extraction sont généralement réunis ; dans certains cas cependant, nous les avons recueillis et étudiés séparément. Ces résidus abandonnent toujours d'importantes quantités de sels séparés par filtration ; la liqueur filtrée est ensuite réduite à sec, sous courant d'azote, température inférieure à 30 °C, par additions répétées de petites quantités d'éthanol absolu. Le reste est enfin repris par le mélange hexane-chloroforme (2/1, V/V) jusqu'à épuisement. Cette solution est à son tour concentrée, reprise par un petit volume (50 ml au maximum) du mélange solvant, et longuement lavée à l'eau distillée, jusqu'à ce que la phase aqueuse de lavage soit par-

faitement neutre et claire selon les protocoles décrits par FOLCH (1957), ISAO SHIBUYA (1960) et NELSON (1962). La solution lipidique hexane /chloroforme est à son tour évaporée – avec les mêmes précautions que ci-dessus –, déshydratée par le sulfate de sodium anhydre et le résidu d'évaporation repris, soit par l'éther de pétrole (30-50 °C), il y a toujours un résidu insoluble dans ce cas, soit par le chloroforme pur, la reprise est alors totale.

Tous les solvants employés au cours de ces opérations sont ou des produits purs pour analyse ou des produits soigneusement déshydratés et redistillés avant usage.

TABLEAU VI

Espèce et date de récolte	Poids frais en grammes	Poids de lipides totaux en grammes	Lipides totaux pour 100 grammes	
			d'algues fraîches	d'algues sèches
<i>Lemanea nodosa</i>				
6 Avril	280	1,853	0,661	8,051
1 ^{er} Juin	300	3,115	1,038	5,160
9 Juillet	200	2,216	1,108	4,125
<i>Sacheria fucina</i>				
12 Avril	241 st*	0,409	0,169	—
<i>Gelidium sesquipedale</i>				
28 Septembre	1000 st*	6,335	0,633	—
<i>Furcellaria fastigiata</i>				
12 Avril	1353 st*	1,926	0,142	0,960
<i>Rhodymenia palmata</i>				
7 Février	1745 st*	7,577	0,434	4,181
4 Février	919 ♂	5,740	0,624	5,517
<i>Bornetia secundiflora</i>				
28 Septembre	800	5,417	0,677	—
<i>Polysiphonia elongata</i>				
9 Février	352 st*	0,608	0,172	1,496

* stérile, ♂ plante mâle.

La déshydratation des solutions de lipides totaux par passage, sur colonne de cellulose, selon la technique de KATES a été abandonnée, par suite de pertes importantes entraînées par ce procédé.

Le tableau VI ci-dessus indique les valeurs des lipides totaux rapportés à 100 grammes d'algues fraîches, puis à 100 grammes d'algues sèches d'après les valeurs du tableau V. Ces lipides représentent l'ensemble des extraits, provenant et des alcools de fixation et des alcools d'extraction.

Si les variations, pour 100 grammes d'algues fraîches sont ascendantes, on remarquera que les variations sont de même sens

entre pieds stériles et pieds fructifiés. Quant aux variations rapportées aux poids secs, pour ce qui concerne *Lemanea nodosa*, elles mettent bien en évidence que la transformation des gonimoblastes en carposporocystes s'accompagne d'une forte augmentation non seulement des poids secs, mais aussi des autres réserves : amidon floridéen, sucres solubles, sans négliger l'augmentation des masses cytoplasmiques, membranaires, etc...

Enfin ce tableau VI a l'avantage de bien montrer qu'il existe tant chez les algues dulçaquicoles que marines, des substances ayant des caractères de solubilité, identiques à ceux des lipides végétaux. Mais ces quantités sont très faibles, ce qui, par ailleurs, explique les difficultés de leur analyse ; et que ces valeurs sont très éloignées de celles que l'on obtient par extraction des herbes, des graines, appartenant aux Phanérogames.

III. — ADSORPTION DES PIGMENTS LIPOSOLUBLES SUR CHARBON ACTIF

Les liqueurs alcooliques de fixation sont généralement colorées en brun ou en jaune verdâtre, qu'elles proviennent des algues marines ou dulçaquicoles ; mais toutes les liqueurs éthanoliques d'extraction sont vertes. Les solutions lipidiques, éther de pétrole ou chloroforme, qui en découlent sont tout aussi fortement pigmentées. Notant qu'après leur saponification une partie de ces pigments passe avec les acides gras, notre première intention fut donc la séparation de ces pigments en solution, d'avec les lipides bruts.

D'autre part, nous savons que les huiles aussi fortement pigmentées ne peuvent être soumises à l'examen spectrophotométrique en lumière ultra-violet (Méthode A.O.C.S. Cd 7-58).

Pour décolorer ou blanchir les huiles, l'industrie emploie couramment les terres actives, le noir animal ; les noirs, minéral et végétal, purifiés et activés, beaucoup plus coûteux, sont réservés à l'usage du Laboratoire.

Pour nos extraits, les terres activées, le noir animal ne peuvent convenir, en raison d'une part de leur composition, et aussi, depuis la mise en garde de J.P. WOLFF, de M. NAUDET, dont les travaux portant sur les huiles alimentaires montrent que ces modes de blanchiment sont à l'origine de modifications structurales importantes, surtout si les composés possèdent des liaisons éthyléniques. De même la méthode de raffinage préconisée par PONS et coll., comportant l'action couplée du noir végétal (0,6 %) et d'alumine activée, ne peut être retenue car il faut alors opérer à la température de 225 °C.

Le noir ou charbon actif lavé (MERCK), a donc été choisi. A la température du Laboratoire que l'extrait lipidique soit sec, ou en

solution — éther de pétrole 35-50 °C, — il donne peu de rendement. Celui-ci s'améliore si on élève la température du mélange. Mais surtout il n'y a adsorption des pigments, qu'à partir du moment où l'on ajoute à la solution lipidique au moins 50 % en poids de charbon. Dans la plupart des cas, ces valeurs peuvent atteindre 100, 200 % et même au-delà : poids de charbon/poids de lipides colorés : c'est dire que nous sommes loin des taux 0,5 à 4 % maximum usuellement prescrits, mais totalement inopérants dans le cas des huiles d'algues. Une meilleure adsorption des pigments liposolubles est obtenue lorsque la quantité requise de noir est ajoutée à la solution lipidique, éther de pétrole — le mélange chauffé légèrement (température inférieure à 50° C). Le passage de la même solution sur une colonne contenant un même poids de charbon, donne un moins bon résultat.

Trois extraits lipidiques bruts ont ainsi été « blanchis » ils correspondaient à :

- Furcellaria fastigiata* (stérile),
- Lemanea nodosa* (avril, jeunes gonimoblastes),
- Rhodymenia palmata* (pieds à tétraspores).

Technique.

Dans un ballon à col rodé (250 ml), contenant 50 à 100 ml de solution lipidique brute (éther de pétrole, Eb 30-50 °C), on ajoute d'abord un poids de charbon égal à la moitié de celui des lipides. Le mélange est chauffé lentement à température inférieure à 50 °C sous réfrigérant à reflux. On renouvelle l'opération si la solution lipidique filtrée est encore pigmentée.

Le résidu obtenu après évaporation du solvant est alors pesé. Selon son importance, sur quelques fractions on détermine les caractéristiques chimiques : indices d'iode, d'acide..., etc... Le reste est ensuite saponifié : il fournit les deux fractions classiques : insaponifiable, acides gras totaux.

D'autre part le charbon qui a servi à l'adsorption des pigments liposolubles est lavé dans l'entonnoir par des volumes successifs de solvants de plus en plus polaires d'éther sulfurique, d'acétone, d'alcool 96 %, chauds et jusqu'à entraînement nul des substances adsorbées. Ces solutions réunies, évaporées, laissent un résidu vert-jaunâtre saponifié à son tour.

Nous indiquerons à titre d'exemple, la série des opérations, consignées dans le Tableau VII et concernant *Furcellaria fastigiata* : ce lot de 880 grammes (poids frais) a fourni :

0,210 g de lipides totaux pour la liqueur de fixation

0,970 g de lipides totaux pour la liqueur d'extraction.

Cette quantité de 0,970 grammes fut décolorée par 1 gramme de charbon. Par filtration et lavage on a recueilli 0,193 gramme

de lipides totaux incolores, solubles dans l'éther de pétrole. Par saponification, ce poids fournit : $\left\{ \begin{array}{l} 0,032 \text{ g d'insaponifiable} \\ 0,085 \text{ g d'acides gras} \end{array} \right.$

TABLEAU VII

<i>Eurelleria fastigiata</i> 880 grammes (poids frais), stérile						
Origine	Poids de Lipides totaux en g.	Poids de Lipides saponifiés	Insaponifiable		Acides gras	
	0,210			Insapo% Lipides totaux		Acides gras % Lipides totaux
Liquueur de fixation	non décolorée →	0,210	0,016	7 %	0,096	45 %
	0,970					
Liquueur d'extraction	1 g. charbon →	0,285 (récupérés)	0,019	6 %	0,090	31 %
	↓					
	0,193 (filtrés) →	0,193	0,032	17 %	0,085	44 %

Enfin cette même colonne de charbon, après lavages par les solvants polaires, comme indiqué ci-dessus, a abandonné 0,285 g de substances très fortement pigmentées, qui par saponification, livrent $\left\{ \begin{array}{l} 0,019 \text{ g d'insaponifiable} \\ 0,090 \text{ g d'acides gras} \end{array} \right.$

Résultats.

Les tableaux VII, VIII et IX indiquent quelles quantités d'insaponifiable et d'acides gras ont été obtenues selon la méthode décrite ci-dessus, ainsi que les pourcentages de l'insaponifiable et

TABLEAU VIII

<i>Lemanea nodosa</i> 465 grammes (poids frais) Avril						
Origine	Poids de lipides totaux en g.	Poids de lipides saponifiés	Insaponifiable		Acides gras	
	1,428			% L.T.		% L.T.
Liquueur de fixation	3,4 g. charbon →	0,265	0,028	10 %	0,078	29 %
	↓					
	0,788	→ 0,508	0,049	10 %	0,347	68 %
	→	0,268	non transestérifiées directement			

des acides gras rapportés aux lipides totaux. Pour *Rhodymenia palmata*, les valeurs de l'insaponifiable ne sont pas signalées ; on y ajoute cependant le rendement : acides gras + insaponifiable / lipides totaux.

TABLEAU IX

<i>Rhodymenia palmata</i> 1500 grammes (poids frais), tétraspores					
Origine	Poids de lipides totaux en g.		Poids de lipides saponifiés	Acide gras % de LT	Rendement % de LT
	4,370				(Acide gras + insapo.
	↓				
	2,5 g. charbon →	0,860		21 %	22 %
Liqueur de fixation	↓				
		1,448 chroma-	élués par éther P. 0,683	72 %	89 %
	2,899 dont. →	tographiés sur acide silicique	élués par éther S. 0,138	68 %	90 %
			élués par méthanol 0,605	20 %	21 %

Discussion et conclusion.

Les teneurs en lipides des trois algues étudiées ici sont : généralement faibles

- extrêmement différentes, correspondant ainsi fidèlement à l'état physiologique de chacune d'elles — Les fortes quantités sont relatives aux pieds à tétraspores de *Rhodymenia palmata*.

On souligne encore que si les quantités de charbon employées sont grandes, grandes sont aussi celles des lipides (?) adsorbés (50 %), et très petite la valeur des lipides (?) récupérés par lavages successifs du charbon.

Enfin les teneurs en insaponifiable sont élevées, supérieures, dans tous les cas, à celles que l'on obtient couramment par saponification des graisses de réserves, végétales (huiles de graines oléagineuses par exemple, et même graisses d'herbes fourragères où l'insaponifiable représente 0,5 à 1 % des lipides totaux).

Quant aux acides gras, ceux appartenant aux lipides élués par l'éther de pétrole à partir du charbon pourraient être d'origine glycéridique. En effet, par saponification d'un tributyrde nous obtenons 87,5 % d'acide butyrique, la même hydrolyse fournit 96 % d'acide érucique à partir du triérucide. Ce qui implique donc pour les huiles végétales comportant outre des mélanges de glycérides, un insaponifiable (hydrocarbures, stérols, etc...) des rendements

légèrement inférieurs, assez proches alors de ceux que nous observons pour les huiles d'algues : cas particulier de *Rhodymenia pal-mata* (89 et 90 %).

Nous pouvons donc déjà affirmer : que l'adsorption des pigments chlorophylliens par le charbon n'entraîne pas de pertes en triglycérides ; que les acides gras appartenant aux lipides adsorbés avec les pigments (31 %, 29 %, 21 % des lipides totaux) ne représentent qu'une fraction petite de la molécule de départ, supposée lipidique et retenue par le charbon.

IV. — SÉPARATION DES DIFFÉRENTS LIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES D'ACIDE SILICIQUE

Différents essais de séparation par chromatographie sur colonne, d'alumine, d'acide silicique nous ayant donné des résolutions peu satisfaisantes, à partir des solutions de lipides bruts, nous avons plus récemment tenté d'atteindre le même but par chromatographie sur couches minces.

Cette forme de chromatographie présente par rapport aux autres méthodes, plus anciennes, des avantages incontestables : malléabilité, rapidité, reproductibilité.

Technique.

La méthode adoptée dérive de celle mise au point par STAHL, elle fut de plus décrite d'une manière très précise, par MANGOLD en 1961 ; elle se trouve actuellement employée diversement.

L'appareillage dont nous disposons est commercialisé par la firme allemande DESAGA. L'applicateur « Modèle S » permet de recouvrir les plaques de verre (20 × 20 cm) d'une couche homogène, d'épaisseur uniforme (275 μ) de gel de silice (MERCK), à 10 % de sulfate de calcium, en suspension dans l'eau (30 grammes de gel de silice pour 60 ml d'eau distillée). La prise étant rapide, le broyage est limité à 1 minute dans un mortier, l'étalement de la bouillie sur les 6 plaques de verre, à 3 minutes. Laissées d'abord séchées à l'air (20 minutes), les chromatoplaques sont ensuite portées à l'étuve, réglée à 110° C, pendant 2 heures. Après refroidissement, en exsiccateur, les plaques sont alors prêtes pour une chromatographie. Dans le cas de nos lipides d'algues, l'expérience a prouvé que les résolutions étaient meilleures sur les plaques récemment activées par chauffage à l'étuve.

Les solutions lipidiques d'algues (10 % poids/vol. dans le chloroforme pur) sont appliquées par dépôts à 2 cm du bord des plaques, dans le sens d'étalement du gel de silice, et à l'aide de micropipettes

(10 à 100 μg de substance), les taches étant placées à 1 cm les unes des autres.

L'élution est obtenue — suivant les mélanges de solvants utilisés — en moins d'une heure, dans des jarres de verre étanches. La sursaturation de l'atmosphère de l'enceinte est assurée, une heure avant le départ de la chromatographie, en collant deux feuilles de papier filtre sur les deux plus grandes faces de la cuve.

Les taches, naturellement colorées, obtenues à partir des lipides d'algues sont d'autant mieux séparées que les mélanges d'élution seront enrichis en solvant polaire (éther éthylique). Les mélanges V/V, en ml, 95/5, 90/10, hexane/éther sulfurique ou éther de pétrole (40-60°)/éther sulfurique étaient aussi peu actifs que l'éther de pétrole seul. Il suffit d'ajouter 1 ml d'acide acétique (p.p.a.) au mélange 90/10 pour obtenir en 1 heure, une élution déjà satisfaisante. Si on utilise à la suite les mélanges 80/20/1, 70/30/2, les temps d'élution sont diminués, et la séparation des substances apolaires ou peu polaires, des substances polaires est bien supérieure.

L'ensemble des réactifs utilisés, indépendamment ou simultanément pour la révélation et l'identification, des substances isolées sur chromatoplaques est porté au Tableau X. On y trouvera les révélateurs indiqués par MANGOLD, VIOQUE et ceux utilisés classiquement en chromatographie sur papier (LEDERER) et même en histochimie (PEARSE).

L'identification des composants des lipides algaux, outre les tests de coloration, mentionnés ci-dessus, fut renforcée par la co-chromatographie de témoins purs, et en mélange, comparaison de leur R_f , de leur coloration à ceux des inconnus. Ont été utilisés : les acides gras purs, estérifiés, hydrogénés, des huiles (lin, olive), des glycérides de synthèse (mono-, et di), des triglycérides purs homogènes et hétérogènes, le cholestérol, les acides gras supérieurs, en solutions chloroformiques, et aussi, quelques oses simples (galactose, fructose, glucose). Enfin les éluions par des mélanges contenant des proportions variées de solvants très différents (chloroforme, méthanol, eau, pyridine, acétone) fournissent également des renseignements utiles.

Résultats.

Quelques-uns ont fait l'objet d'une courte note (LAUR, 1963). Les reproductions ci-jointes (fig. 5, 6, 7, 8) de quatre chromatogrammes, comparées aux calques donnés par MANGOLD et MALINS et par VIOQUE représentant les chromatographies de substances connues, étayeront nos affirmations.

En raison de la répétition chromatographique, nous avons adopté une division arbitraire, en cinq parties (A à E) des chroma-

TABLEAU N

RÉACTIF	COULEUR DES TACHES	SUBSTANCES MISES EN ÉVIDENCE
1 Lumière du jour	couleurs différentes sur fond blanc	composés, colorés naturellement
2 Lumière ultraviolette	fluorescence blanche fluorescence jaune d'or à brun fluorescence verte, vert-jaune	glycolipides, sucres ? chromolipoides vitamine A, caroténoïdes
3 Dichloro 2-7-fluorescéine 0,2 % dans éthanol 96 %	en lumière U.V. : tache jaune verte sur fond pourpre	lipides non polaires, saturés et insaturés esters de sucrose
4 Vapeurs d'iode	brun noir ou jaune, sur fond blanc	les hydrocarbures (caroténoïdes, squalène), les stérols et stéroïdes, tous les lipides insaturés et azotes et les hydrates de carbone
5 Rhodamine B, 0,05 %, dans éthanol 96 %	pourpre sur fond rose	beaucoup de lipides.
6 Rhodamine 5 G (Marinetti)	en lumière U.V. : bleu ou pourpre ; jaune	phosphatides acidiques, phosphatides neutres
7 Trichlorure et pentachlorure d'antimoine, en solutions saturées, dans chloroforme ou tétrachlorure de carbone, anhydres.	bleu	vitamine A, caroténoïdes (réactif de CamB et Parré), stéroïdes glycosylés stéromiques, sté- roïdes et lipides aliphatiques.
8 Acide phosphomolybdique, 10 % dans éthanol 96 %	bleu sur fond jaune, après chauffage à 100°C	lipides neutres, antioxygènes, lipides insaturés et complexes (choline, cephaline, etc.), cholestérol,
9 Dichloroquinone 2,6-chlorinide, 1 %, dans éthanol 96 %	brun violet	avec les antioxygènes (D G A, - acide nordihydro-gaïnaréctique)
10 acide chromique, ou bichromate de potassium, à saturation dans l'acide sulfurique concentré, et en chauffant à 100°.	jaune au début du chauffage rose azuré au début du chauffage marron rougeâtre au début du chauffage carbonisation en fin de chauffage	composés insaturés, cholestérol, stérols et leurs esters, phospholipides tous les composés organiques.

11	DRAGENDORFF modifié selon MUI- NIER et MACHEBOUT	orange, rouge orangé	phosphatides choline,
12	Ninhydrine 0,25 % dans l'acétone	pourpre	spécifiques des groupements NH_2 , libres,
13	Diphénylamine 10 %, dans alcool 96 %	gris bleu sur fond gris clair	glycolipides,
14	Réaction LEMIEUX-BAUER au pé- riodate permanganate.	jaune verdâtre (pH 7 à 10)	sucres réducteurs, définis — si on bloque les doubles liaisons par un traitement préalable (I_2 , Br selon PEARSE), seuls les sucres répondent au perman- ganate et au Schiff.
15	Réaction : BUCHANAN-DEKKER- LONG periodate-Schiff	bleu ou pourpre	détection des 1 : 2 glycols formant des dialdéhydes mis en évidence par le Schiff.
16	Dinitro 2,4-phénylhydrazine, 0,5 % dans HCl 2N.	jaune ou orangé	sucres réducteurs ou non, acides hydroxyés, glycolipides, ribonucléosides,
17	Naphtorésorcinol en solution chlo- rhydrique (2N)	à t° ordinaire bleu sur fond rose, rouge vif à 75°	aldéhydes et cétones,
18	Anthrone dans SO_4H_2 concentré	à 100° coloration stable vert bleu	acides uroniques, saccharose, raffinose, cétoles,
19	Permanganate de potassium, 1 % dans l'eau	taches brunes	pentoses, hexoses,
20	Phthalate acide d'aniline.	taches brunes	lipides insaturés, sucres,
21	Nitrate d'argent ammoniacal (DEDONDER)	taches noires	galactose, aldohexoses, méthylpentoses, acides uro- niques,
22	Diphénylamine-p-anisidine (BAILEY).	bleu, bleu vert	sucres réducteurs, acides uroniques, osamines, alcools polyhydroxyés, sucres non réducteurs,
23	Réactif de Molisch (α naphtol).	rouge violet à violet	D-glucose, D-galactose et tous les aldoses réduc- teurs. Tous les saccharides, cérébrosides, gangliosides.

logrammes. Pour chacune, nous préciserons ses caractéristiques selon les données du tableau X et nous essayerons de conclure de la nature possible des corps ainsi sériés.

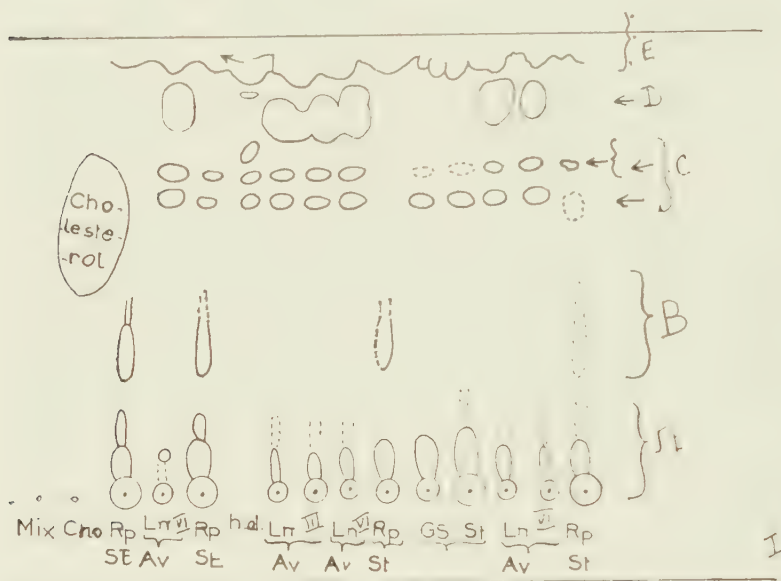


Fig. 5. — Calque I : Mélanges d'élution : hexane/éther sulfurique / acide acétique. 90/10/1 $\rightarrow$ 1^h ; 70/30/1 $\rightarrow$ 1^h ; 60/40/2 $\rightarrow$ 1^h ; Révélateurs : vapeurs I² (-4) - acide chromique à saturation dans l'acide sulfurique concentré (10).

A : à la ligne de dépôt des taches : se présentent des marques allongées, $R_f = 0$, ayant les particularités suivantes :

coloration naturelle ocrée, avec fluorescence

1) blanche brillante en lumière ultra-violette

2) vert-jaune, dans les mêmes conditions, après aspersion par la solution de dichlorofluorescéine ;

coloration brun-violet, très foncé, même après temps court d'exposition aux vapeurs d'iode ;

coloration bleue, puis noire par aspersions successives

1) d'une solution d'anthrone

2) d'une solution d'acide chromique et carbonisation 110°-130° C

coloration grise, à la diphénylamine

coloration orangée, au mélange de DRAGENDORFF

coloration bleu-vert, après aspersion de diphénylamine-para-anisidine (BAILEY) ;

coupure oxydante (?), coloration par réactif LEMIEUX-BAUER ;
coloration rouge-violacée après réaction de MOLISCH (α naphtol) ;

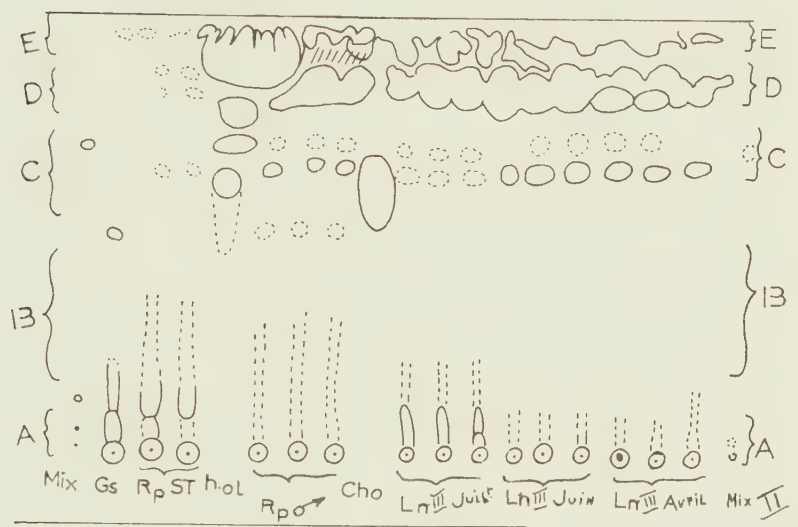


Fig. 6. — Calque II : mélanges d'éluion : hexane / éther sulfurique / acide acétique. — 90/10/1 $\rightarrow$ 1^h ; 70/30/2 $\rightarrow$ 1^h ; 60/40/2 $\rightarrow$ 1^h.
Révélateurs : vapeurs d'iode (4) - puis acide chromique à saturation dans l'acide sulfurique concentré (10).

coloration bleu-violacé après réaction de BUCHANAN ;
coloration positive au phthalate d'aniline ;
enfin entraînement rapide par le mélange 70/20/2, V/V/V, chloroforme/méthanol/eau.

- B :** *au-dessus groupes (de 2 à 3 taches) ou trainées naturellement colorées de vert ;*
ils présentent : en lumière ultra-violette la fluorescence rouge de la chlorophylle ;
ils se carbonisent par la solution saturée d'acide chromique dans l'acide sulfurique concentré ;
- C :** *deux taches superposées, placées légèrement au-dessus de celle du cholestérol témoin ; elles sont :*
brun foncé après exposition aux vapeurs d'iode ;
bleutées par l'acide phosphomolybdique ;
carbonisées par la solution sulfurique d'acide chromique avec les variantes suivantes ;

la tache la plus inférieure (des 2), passe au préalable
par les teintes rose, azur ;
elles réagissent avec les solutions de tri et pentachlorure
d'antimoine :
pourpre (la plus inférieure) \ après action du péri-
bleu (la tache supérieure) / date — Schiff. (BUCHANAN)

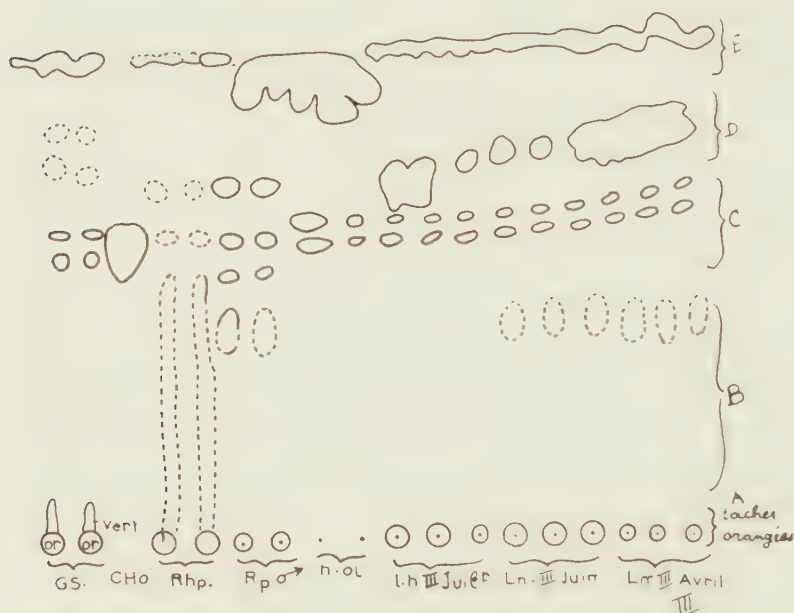


Fig. 7. — Calque III : mélanges d'éluion : hexane / éther sulfurique / acide acétique. — 70/30/2 → 55° ; 60/40/2 → 50° ; Révélateurs : Diphénylamine (13), Dragendorff (11).

- D : *niveau marqué par une tache d'autant plus large si les algues sont en état de reproduction, peu marquée ou même absente pour les algues à l'état stérile* — Ce dépôt prend une :
coloration brun foncé après exposition aux vapeurs d'iode ;
coloration bleu par l'acide phosphomolybdique ;
coloration nette par le périodate-Schiff ;
se carbonise par la solution sulfurique d'acide chromique.
- E : *Tache limitée bien souvent par la ligne de front du solvant, on remarque :*
sa fluorescence vert-jaune en lumière U.V., après aspersion de dichlorofluorescéine ;

sa coloration bleue par l'acide phosphomolybdique ;
 sa coloration brun-violacé par les vapeurs d'iode ;
 sa coloration bleu-violacé après le périodate-Schiff ;
 qu'elle est carbonisée par la solution sulfurique d'acide
 chromique.

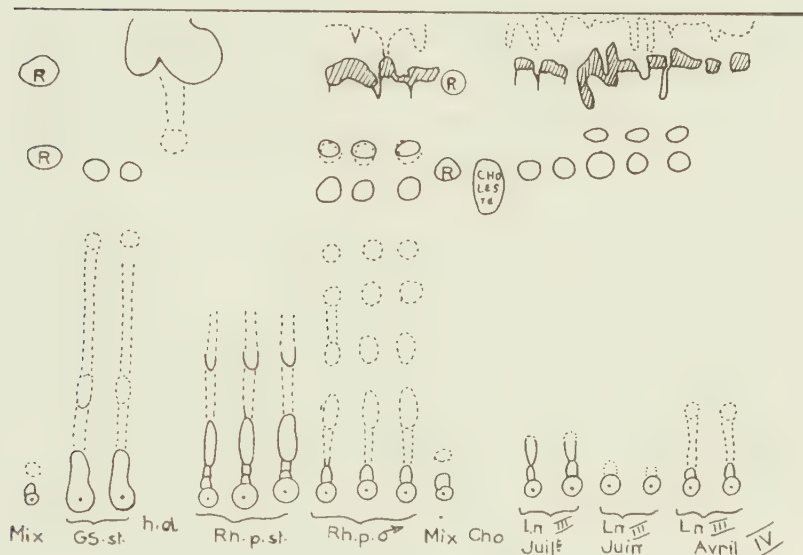


Fig. 8. — Calque IV : mélanges d'élution : 90/10/1 → 50' ; 70/30/2 → 40' ; 60/40/2 → 45'.

Révélateurs : vapeurs d'iode (4), ou phtalate d'aniline (20), ou SbCl_3 - SbCl_5 (7) et acide chromique à saturation dans l'acide sulfurique (10).

Conclusion :

En reprenant ces groupes les uns à la suite des autres et en commençant par le niveau inférieur correspondant aux dépôts des taches :

- A correspondraient aux phospholipides, glycolipides, et lipides complexes des algues, à acides gras insaturés ;
- B ces taches et traînées pourraient représenter les mono et les diglycérides à acides gras insaturés ;
- C au niveau inférieur les stérols libres, de polarité moindre que celle du cholestérol ; au niveau supérieur les acides gras libres (?) ;
- D représenteraient des triglycérides dont les acides insaturés, propres aux algues pourraient être de plus hydroxylés, époxydés ou encore ramifiés ?...

E où aboutit aussi la trioléine, arrêtée souvent par une limite marquée à l'avance, comprend aussi les triglycérides à acides saturés, monoinsaturés, les hydrocarbures, les esters stéroliques, etc...

La nature précise de ces corps, ne pouvant être déterminée d'une façon certaine que par l'analyse ultérieure, après leur prélèvement sur les chromatoplaques. Mais nous constaterons que si leur identité ne peut être ici qu'approximative, la chromatographie sur couches minces permet une bonne séparation des différents lipides des algues. Cependant cette identification deviendra tout de même plus probable lorsque nous comparerons les résultats acquis parallèlement par les techniques de l'histochimie, puis par celles de biochimie ci-après utilisées.

V. — LE PHOSPHORE LIPIDIQUE ET LE PHOSPHORE TOTAL

Les phospholipides n'étant pas décelables au cours de l'observation cytochimique (LAUR, 1957), nous essaierons d'infirmer ou de confirmer leur existence par dosage du phosphore.

Pour le phosphore lipidique le caractère de solubilité ou d'insolubilité dans les solvants, des lipides totaux d'origine biologique, telle par exemple, l'acétone anhydre, en présence des sels : chlorure de cadmium CdCl_2 , chlorure de magnésium MgCl_2 , ne peut trancher de la présence ou de l'absence de phospholipides (cf. CAHN et coll.).

Tandis qu'en huilerie il est bien connu, que les mélanges, formés en quasi totalité, par ce type de lipides complexes, s'insolubilisent très facilement dans l'acétone. Pour *Lemanea nodosa*, les lipides en solution dans l'acétone anhydre, forment toujours un léger précipité, dont la quantité n'augmente pas, malgré les alternances de centrifugation et de repos prolongés au froid, auxquelles on le soumet. Les méthodes chimiques de dosage du phosphore restent donc seules capables de prouver, s'il existe ou non des lipides phosphorés, chez les algues rouges.

Technique.

Après minéralisations — sulfo-nitrique, sulfonitro-perchlorique, sulfo-peroxydique, etc... — le phosphore peut être dosé par volumétrie (THIVOLLE), par gravimétrie (COPAUD), par photométrie (MACHEBEUF et DELSAL) et plus récemment, par spectrophotométrie (WOLFF, DUCET, PAQUOT).

Au début de ce travail nous avons utilisé la méthode volumétrique de THIVOLLE, précédée d'une minéralisation cupro-nitrique. Plus récemment, une minéralisation sulfonitrique, précédait au dosage spectrophotométrique. Dans ce cas le phosphore transformé en complexe phosphovanadomolybdique est mesuré

comparativement à celui contenu dans les solutions étalons, au spectrophotomètre JEAN et CONSTANT, avec cellule antimoine sous $\lambda = 4\,500\text{ \AA}$, comme décrit par SCHEIDECKER, la méthode étant basée sur celle mise au point par FLEURY et LECLERC.

TABLEAU XI

XI A

Espèces	Méthode de dosage	Phosphore lipidique en milligrammes pour 100 gram. *	
		d'algues fraîches	d'algues sèches
<i>Lemanea nodosa</i>			
29 mars	Thivolle	1,2	55,4
19 juin	Thivolle	6,8	29,2
5 juillet	Thivolle	3,4	13,3
7 juillet	Spectrophométrie	2,6	10,3
* moyenne de 4 dosages			

Le phosphore a donc été dosé :
 sur les solutions lipidiques — tableau XI A ;
 sur les algues, préalablement épuisées
 sur des lots identiques d'algues seule- } tableau XI B
 ment séchées à l'air.

XI B

Espèces et état de développement	Traitements antérieurs à la minéralisation	Phosphore total en mg pour 100 g. d'algues sèches
<i>Lemanea nodosa</i>	. algues séchées à l'air	. 325 (1)
9 Juillet, carpospores	. algues épuisées à l'éthanol	. 341 "
<i>Furcellaria fastigiata</i>	. algues séchées à l'air	. 142 (2)
11 Avril, tétraspores	. algues épuisées à l'éthanol	. 182 "
<i>Rhodymenia palmata</i>	. algues séchées à l'air	. 385 (2)
7 Février, tétraspores	. algues épuisées à l'éthanol	. 522 "
1) moyenne de 4 dosages		2) moyenne de 2 dosages

Enfin pour vérifier si les méthodes de minéralisation avaient quelque incidence sur les dosages de l'ion phosphorique, les valeurs obtenues ont été comparées :

- a) après minéralisation sulfonitrique ;
- b) après incinération au four à moufle ;
- c) après incinération au four électrique ;
- d) après incinération au four électrique en présence d'acétate de magnésium.

Ces résultats sont indiqués au Tableau XI C.

XI C

Espèce	Mode de minéralisation	Phosphore total en mg. pour 100 g. d'algues sèches
<i>Lemanea nodosa</i>	a) sulfo-nitrique	321 (1)
9 Juillet	b) incinération-four à moufle (rouge sombre 3 H.)	224 (1)
Algues non épuisées, séchées à l'air	c) incinération : four électrique 540° (20 min.)	243 (1)
	d) id. " " " en présence d'acétate de magnésium	302 (2)
1) moyenne de 4 dosages		2) moyenne de 2 dosages

Résultats.

Le tableau XI A met en évidence de faibles taux en phosphore lipidique pour les extraits de *Lemanea*. Les valeurs décroissant de ce phosphore prouvent aussi que les lipides complexes phosphorés ne sont pas des substances de réserve, ce qui, d'autre part, appuie les résultats obtenus par les méthodes histochimiques et celles de la chromatographie sur plaque.

Ces valeurs en phosphore paraissent s'aligner avec celles que l'on obtient pour les graisses végétales usuelles.

Enfin on souligne la quasi concordance des taux acquis, tant par la méthode volumétrique de THIVOLLE que par celle plus récente de la spectrophotométrie.

En, XI B, le phosphore total dans les trois algues, en état de reproduction, présente d'importantes variations spécifiques. D'autre part, ces teneurs accusent également une présence très discrète de

phospholipides, puisque les algues privées de lipides et quelque peu de sucres, offrent des valeurs, en phosphore total, supérieures à celles d'algues séchées à l'air seulement.

De plus, malgré la défaveur que semble porter DELSAL à la minéralisation sulfonitrique, ce procédé nous a fourni des résultats constants et très reproductibles, portés au tableau XI C.

Discussion.

Si chez *Lemanea*, le phosphore lipidique décroît jusqu'au cinquième de sa valeur, de mars à juillet (tableau XI A) peut-on interpréter cette variation, comme la preuve tangible d'un métabolisme photosynthétique plus important au début de la gamétogénèse? Au cours de cette même période, les substances de réserve, amidon floridéen, floridoside, tréhalose (AUGIER, 1934) et lipides (HENRY, 1949) s'accumulent dans les carposporocystes internes, peu chlorophylliens, le manchon externe formé par les cellules corticales, ne s'accroissant comparativement que fort peu.

D'autre part il appartient à R. ULRICH d'avoir démontré que des fruits de lierre mûrissant, décèlent une corrélation certaine entre, d'une part la maturation, la diminution en phospholipides et une augmentation importante des taux d'acides gras et de stérols. Dans le cas du fruit du lierre, les phospholipides sont seulement localisés dans les cellules du péricarpe vert. Déjà MICHEL-DURAND concluait en 1939, « d'une façon générale les graines riches en réserves lipidiques ne renferment qu'une faible proportion de phosphore lipidique et il ajoutait « la dégradation de la chlorophylle et la disparition des phosphatides sont deux faits corrélatifs ».

Ces réflexions nous amènent à penser que si les phospholipides appartiennent aux chloroplastes, et peut-être aussi aux différentes membranes de la cellule végétale, ils sont particulièrement abondants dans la plante chlorophyllienne, à l'état végétatif, cas du *Lemanea* en mars. Or les carpospores, tétraspores, internes et en quelque sorte parasites des plantes mères, représentent par rapport à ces dernières une masse sèche importante, aux activités photosynthétiques réduites. Celles-ci ne s'exalteront, sans doute, qu'au moment où ces spores deviendront autonomes.

Enfin les teneurs en phosphore total pour nos espèces concordent d'une manière satisfaisante avec celles indiquées récemment par des auteurs japonais (ISHIBASHI, 1960), à propos de :

Gelidium sp. (octobre : 160 mg pour 100 g matière sèche).

Carpopeltis flabellata (mars : 120 mg pour 100 g matière sèche).

VI. MISE EN ÉVIDENCE DE CERTAINS CONSTITUANTS CHIMIQUES DÉFINIS DANS LES LIPIDES DES ALGUES

Ces constituants consistent principalement en deux fractions : l'insaponifiable et les acides gras. Nous envisagerons donc successivement :

- a) l'insaponifiable et les acides gras totaux de *Lemanea nodosa* (indices chimiques) ;
- b) le comportement chromatographique en phase gazeuse :
 - 1 - des acides gras totaux ;
 - 2 - des acides gras de lipides déjà fractionnés ;
- c) la séparation des acides gras libres par les résines échangeuses d'ions.

1) L'INSAPONIFIABLE ET LES ACIDES GRAS TOTAUX DE LEMANEA NODOSA.

Ces deux termes, résultant de saponification, étaient au début de ce travail, les seuls accessibles. Il était toutefois possible de caractériser : les stérols de l'insaponifiable (réactions colorées, précipitation par la digitonine, etc.), tandis que nous disposions pour les acides gras : des mesures d'indices chimiques (d'iode, d'acide, d'hydroxyle, etc...), de caractéristiques physiques (densité, indice de réfraction, points de fusion, de solidification, solubilités, etc...). La technique de ces diverses mesures est connue depuis fort longtemps : toutes précisions les concernant sont indiquées dans l'ouvrage récemment publié par C. PAQUOT et collaborateurs, (1962).

Résultats.

Ces résultats concernant les acides gras et l'insaponifiable de *Lemanea nodosa* font l'objet du tableau XII A. Ils ont été obtenus par saponification directe du résidu brunâtre et gommeux important, laissé après évaporation à sec des liqueurs alcooliques de fixation et d'extraction, sans aucun lavage intermédiaire. Ce résidu comprenait donc, outre les deux fractions recherchées : des sucres (surtout dans l'alcool de fixation) dont la présence, dans les solutions hydroalcooliques épuisées par l'éther de pétrole, rendait à elle seule, toute tentative de dosage du glycérol, inutile car non significative (dosage des hydroxyles vicinaux).

Les réactions colorées obtenues à partir de l'insaponifiable sont indiquées à la suite au tableau XII B. Cette substance jaune orangé, cristallise facilement en aiguilles longues, associées en houpettes, soit après évaporation de l'éther de pétrole, soit en présence de méthanol pur.

TABLEAU XII

XII A

Espèce	Pour 100 grammes d'algues fraîches					
		Insaponifiables		Acides Gras		
<i>Lemanea nodosa</i>	Poids sec en g.	Poids en mg.	Indice d'iode	Poids en mg.	Indice d'iode	Indice de saponi- fication
19 Mars	7,580	30	..	267	188*	184
15 Avril	12,225	127		508	127*	
19 Juin	23,225	100		778	Fix 88,0 Ext 63,0	
25 Juillet	25,40	122	Fix = 97 Ext = 90	833	Fix = 88 Ext = 59	} 209
* indice moyen des acides gras des solutions fixation et extraction réunies.						

Discussion.

D'après le tableau XII A on remarque que si les teneurs en acides gras totaux varient largement, celles de l'insaponifiable

XII B

Réactions colorées de l'insaponifiable de <i>Lemanea nodosa</i> et de stérols connus						
Substance testée	Indice d'iode	Lieberman Burchard	Salkovski	Bahl	Tortelli Jaffé	Rosenheim
Insapo : Mars (Fix + Ext)		++	++	---	---	---
Insapo : Juillet (Fix Ext)	97 90	++ ++	++ ++	---	---	---
Cholestérol	65*	++	++	++	---	---
Ergostérol	192*	++	---	inconnu	++	++
Sitostérol	61*	inconnu	inconnu	inconnu	inconnu	inconnu
Fucostérol	123*	"	--	"	"	"

* calculés d'après les poids moléculaires

après une augmentation brusque entre mars et avril restent, quasiment stationnaires, jusqu'en juillet. Faut-il en déduire à la suite de CARTER, que cette montée brusque de l'insaponifiable corres-

pondrait effectivement à une importante gamétogénèse ? Alors que KANEDA et ISHI en 1950 sur *Sargassum ringgoldianum* montrent aussi qu'une teneur maximum en stérol se présente à la formation des gamètes, et tombe au minimum après leur libération.

Enfin ces fortes teneurs en insaponifiable sont parallèles à celles que signale G.E. FOGG à propos d'autres algues.

D'un autre côté, si au cours de l'accroissement des carpospores nous remarquons que les taux d'insaponifiable restent presque constants, nous dirons alors que les acides gras, qui, eux, augmentent jusqu'à plus de trois fois leur valeur initiale, ne sont certainement pas combinés aux stérols. Il n'y a sans doute pas non plus de combinaison acides gras-phosphore, pour former des phospho-lipides (voir tableau XI A). Il reste donc à admettre la possibilité de liaisons acides gras-glycérol, ce que sembleraient confirmer les valeurs des indices d'iode (tableau XII A), la chute de ces indices révélant la saturation des acides gras de ces glycérides.

De plus, l'indice d'iode moyen des insaponifiables de *Lemanea* — compte tenu de la présence d'hydrocarbures insaturés — appaierait le stérol de cette algue aux stérols à une seule double-liaison : cholestérol, sitostérol, fucostérol, etc..., tout en l'éloignant de l'ergostérol (2 doubles liaisons). Tandis que la réaction de BAHL, négative pour l'insaponifiable de *Lemanea nodosa*, le séparerait du cholestérol. Cependant TSUDA et coll. (1958) signalèrent la présence de cholestérol dans plusieurs espèces d'algues rouges.

2) COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES GRAS EN PHASE GAZEUSE.

En deçà des méthodes d'analyse signalées ci-dessus, nous disposons encore d'autres moyens de mesure, ce sont :

— la lecture spectrophotométrique en lumière ultra-violette, utilisée largement en France durant ces dix dernières années ;

et la plus récente, la chromatographie en phase gazeuse.

Principes et techniques précises, sont aussi détaillés dans l'ouvrage de PAQUOT et coll.

La méthode d'analyse par spectrophotométrie comporte deux temps, déterminés par la nature même des acides gras insaturés, auxquels elle s'applique exclusivement. En effet, si les liaisons éthyléniques ne sont pas conjuguées — il en faut donc au moins deux — il n'y a pas adsorption de lumière. La conjugaison, des doubles liaisons séparées, s'obtient par isomérisation alcaline et provoque alors des absorptions du spectre ultra-violet à des longueurs d'onde bien définies.

Quelques essais, nous avaient amenée en 1959 à déceler la présence d'acides gras à 2, 3, 4 et même 5 doubles liaisons pour *Lemanea nodosa* et *Rhodymenia palmata*. Mais ceux-ci, étant par leur nature même très facilement oxydables, la présence toujours possible de peroxydes rendait ces résultats peu précis. D'autre part, cette méthode d'usage délicat, ne permet, à elle seule, que d'édifier des hypothèses, quant à la valeur du nombre de carbone des acides gras insaturés. La quantité toujours petite, souvent inférieure au gramme, des acides gras extraits de nos algues, n'en permettait pas la distillation fractionnée, et ainsi de comparer les résultats fournis par ces deux modes d'analyse.

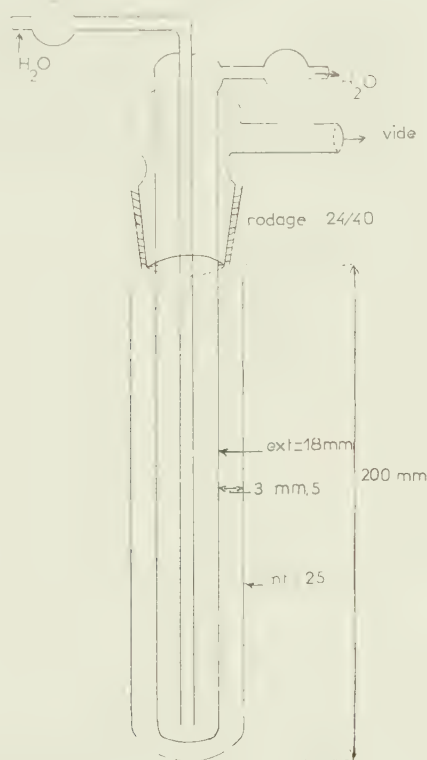


Fig. 9. — Appareil de « microsublimation ».

Plus récemment, la chromatographie en phase gazeuse a été très largement utilisée comme autre moyen d'investigation. Devenant d'usage très courant en chimie, ses possibilités d'études dépassent maintenant le domaine de la Lipochimie. Nous ne donnerons

donc que quelques précisions quant à la manière dont nous l'avons menée pour nos lipides d'algues.

Technique.

L'estérification des acides gras, ou plus exactement leur méthanolyse, nécessite : un milieu anhydre et la présence d'un catalyseur (acide paratoluène sulfonique ou APTS, gaz chlorhydrique, etc...). On y a aussi ajouté quelques parties pour 1 000 d'antioxygène (acide nordihydroguaiarétique ou N.D.G.A.). Lorsqu'il s'agit de lipides totaux, pour faciliter leur solubilité, au moins 10 ml de benzène anhydre sont ajoutés au mélange. Le temps d'ébullition est, dans ce dernier cas, de 4^h au moins, il est réduit à 1^h, dans le cas des acides gras provenant de la saponification. Les poids de substances avant l'estérification et les poids d'esters obtenus sont notés.

Ces esters sont ensuite « sublimés » dans l'appareil de KOEHLER et HILL (fig. 9), selon les conditions prescrites par STOFFEL, CHU et AHRENS, la seule différence étant ici la température du bain d'huile, fixée à 115° C. Le poids des esters récupérés, presque incolores, est noté : il indique l'arrêt de la « microsublimation ».

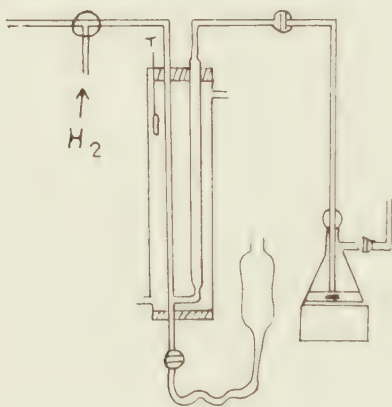


Fig. 10. --- Appareil d'hydrogénation quantitative.

Pour comparaison, un lot de ces esters était hydrogéné dans l'appareil (fig. 10). Les poids avant et après hydrogénation, et le temps de cette opération sont aussi notés. Le catalyseur ici employé était un catalyseur au palladium sur alumine, plus actif que celui au palladium/sulfate de baryum. Le cyclohexane (p.p.a.) est pris comme solvant.

L'identification des esters d'acides gras, est obtenue selon les données classiques. La caractéristique de ces esters peut s'exprimer par leur volume de rétention apparent V'_r mesuré à partir du pic de sortie de l'air, ou d'élution du solvant. La formule est alors :

$$V'_r = tr \times Ds$$

tr et Ds , signifiant respectivement : le temps de rétention et le débit gazeux. Ces valeurs sont toujours portées sur les chromatogrammes et sont constantes pour toute la série d'analyses. Celle-ci comporte en effet, les esters d'algues, les mêmes esters mais hydrogénés, et les esters témoins d'acides purs, connus. Nous pensons qu'il suffit, ce qui est beaucoup plus rapide, de prendre les distances et de les rapporter aux longueurs de chaîne équivalente. La distance est mesurée entre : le pic origine — ou pic d'émergence du solvant —, et le pic d'émergence des esters d'acides gras. La précision de cette mesure est rendue beaucoup moins facile si les pics considérés se chevauchent, s'étalent, ou sont trop petits.

Tous les calculs (rapportés à 100 des esters totaux) ont été faits par triangulation. La position de la ligne de base de ces triangles étant souvent l'occasion d'erreur.

Ces mesures ont été faites parallèlement sur deux colonnes chargées en phases stationnaires différentes ; l'une polaire constituée par une phase polyester, soit de succinate de diéthylène glycol (S.D.E.G.), soit plus rarement par le succinate d'éthylène glycol (S.E.G.), l'autre apolaire, par l'Apiezon M ou L. L'ordre d'élution sur le premier type de colonne est : esters saturés, mono, di, tri-insaturés ; sur le second type : tous les esters insaturés sont élués ensemble et avant leur homologue saturé.

Enfin à l'aide des esters témoins et pour les deux phases stationnaires, on peut tracer deux sortes de courbes. En ordonnée sont portées les valeurs logarithmiques, soit des volumes de rétention, soit, ce qui est notre cas, des distances à l'origine ; tandis qu'en abscisse sont portés les nombres d'atome de carbone des esters correspondants.

Les esters mono, di, tri-insaturés sont à l'origine des courbes (en pointillés sur les graphiques), parallèles à celles des esters saturés témoins. Ou bien ils sont calculés en longueur de chaîne équivalente (L.C.E.) (en acide saturé) (voir graphique 3).

Pour les esters inconnus on calcule les mêmes valeurs et d'après la place qu'elles occupent sur les courbes précédentes l'hypothèse de leur nature devient plus précise et plus valable.

Cette méthode a été appliquée :

a) *Aux esters d'acides gras totaux.*

Nous ne donnerons de ce cas qu'un seul exemple et pour montrer comment se présentent les chromatogrammes (voir I et I').

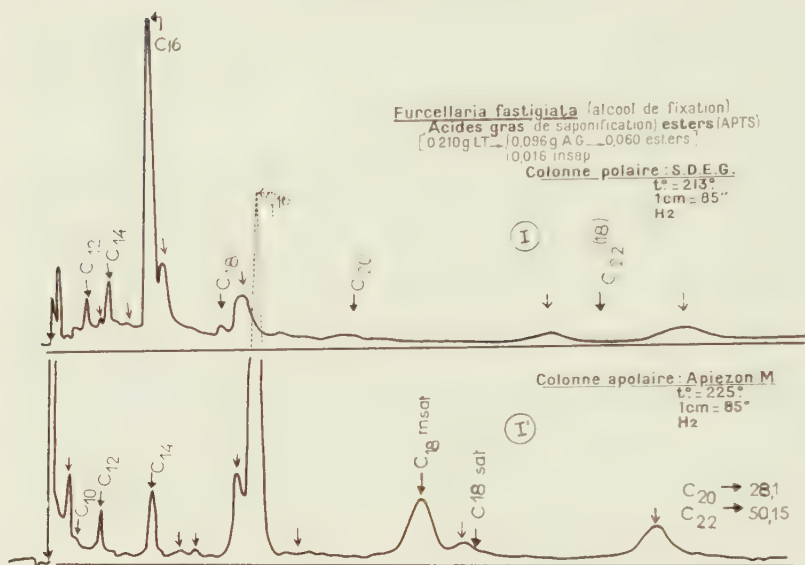
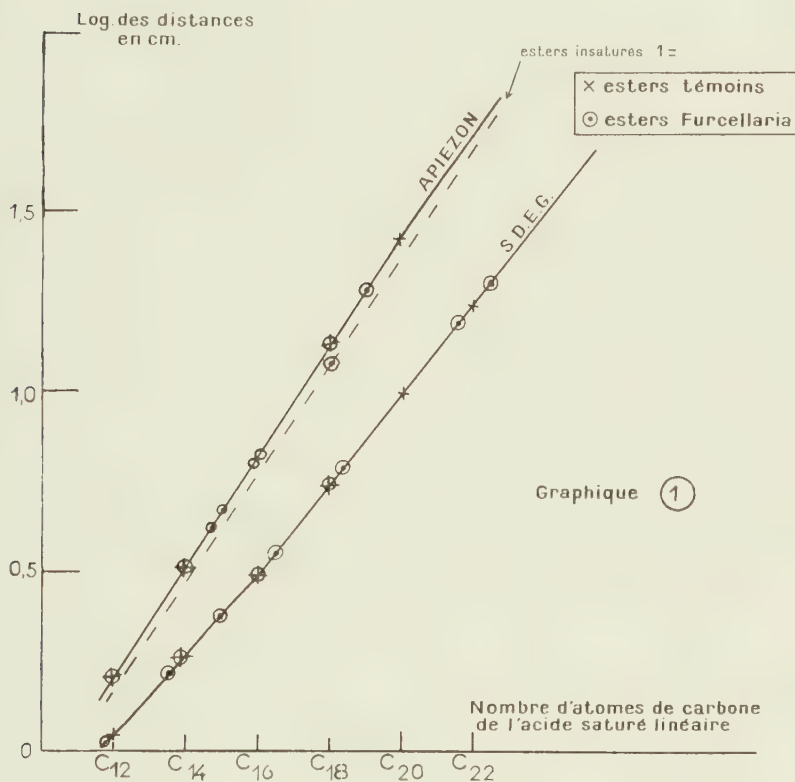


TABLEAU XIII

<i>FURCELLARIA fastigiata</i> ; chromatogrammes I et I'					
Colonne polaire : S.D.E.G.			Colonne Apolaire : Apiezon M		
esters méthyl. acides témoins	Long. chaîne, (ac. sat.), équivalente	pour 100 des ac. gras totaux	esters méthyl. acides témoins	Long. chaîne, (ac. sat.), équivalente	pour 100 des ac. gras totaux
C ₁₂ laurate	11,8	2	C ₁₂ laurate		
	12	2		12	2
	12,6	1			
C ₁₄ myristate	14	6	C ₁₄ myristate	14	6
	15	1		14,7	1
C ₁₆ palmitate	16	35	C ₁₆ palmitate	15	1
	16,5	17		15,9	11
C ₁₈ stéarate	18	3	C ₁₈ insaturés	16	43
	18,4	14		17,7	17
C ₂₀ arachidate	20		C ₁₈ stéarate	18	5
	21,6	5		19	14
C ₂₂ béhénate	22		C ₂₀ arachidate	20	
	22,5	14		22	

Le graphique 1 permet de lire en abscisse les longueurs de chaîne équivalente en acides saturés de nos inconnus.

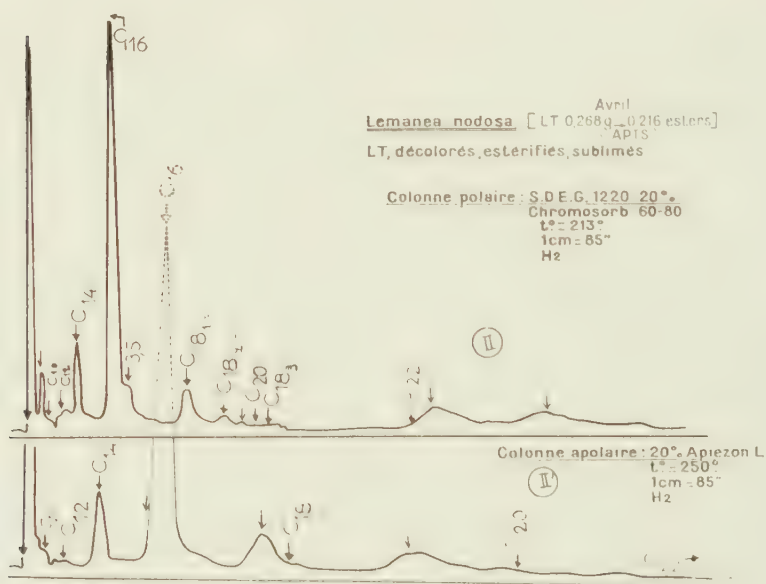
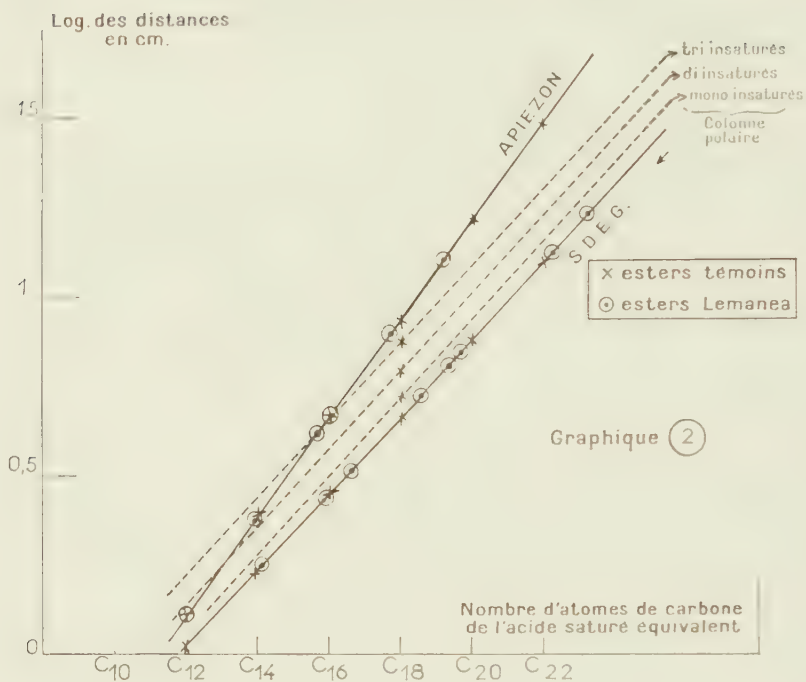


Au Tableau XIII sont portés : ces valeurs équivalentes et les pourcentages en esters inconnus de nos mélanges.

Ces trois rapports proviennent des esters méthyliques (APTS) de *Furcellaria fastigiata* (liqueur alcoolique de fixation), consécutifs à la saponification de l'extrait éther de pétrole de la solution lipidique - graphique 1, chromatogrammes I et I', tableau XIII (se reporter aussi au tableau VII).

b) Aux esters d'acides gras provenant de lipides fractionnés, et tout particulièrement de ceux dont les pigments ont été adsorbés par le charbon.

Nous ne donnerons ici que les résultats détaillés obtenus à propos de *Lemanea nodosa*, suivis par les pourcentages correspondants à *Rhodomenia palmata*.



Les chromatogrammes II, II', correspondent au graphique 2 et au tableau XIV, concernant la fraction interestérifiée des lipides

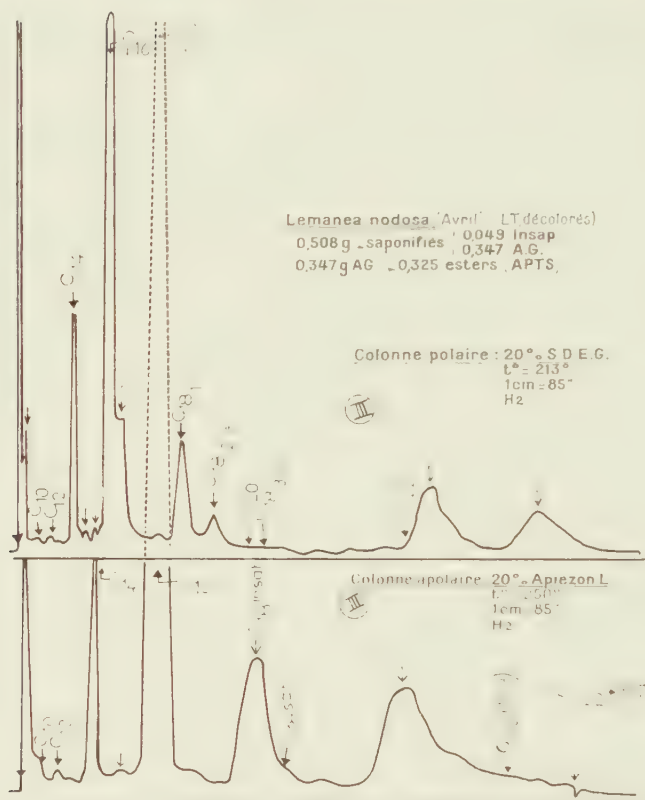
TABLEAU XIV

<i>Lemanea nodosa</i> : chromatogrammes II et II'					
Colonne polaire : S.D.E.G.			Colonne apolaire : Apiezon L		
Esters méthyl. d'acides témoins	Longueur de chaîne, ac. sat. équival.	pour 100 des acides gras totaux	Esters méthyl. d'acides témoins	Longueur de chaîne ac. sat. équival.	pour 100 des acides gras totaux
C ₁₀ caprate	< 10	3	C ₁₀ caprate	10	trace
C ₁₂ laurate			C ₁₂ laurate	12 13,9	trace 9
C ₁₄ myristate	14,1 15,9	5 11	C ₁₄ myristate		
C ₁₆ palmitate				14,7	trace
	16,7	5	C ₁₆ palmitate	16,0	69
C ₁₈ stéarate					
C ₁₈ 1 = oléate	18,6	6		17,8	12
2 = linoléate	19,4 19,6	4 2	C ₁₈ stéarate		
C ₂₀ arachidate				19,2	10
C ₁₈ 3 = linolénate	21,1		C ₂₀ arachidate		
C ₂₂ béhénate			C ₂₂ béhénate		
	22,2 23,2	18 16			

totaux dépigmentés (cf. tableau VIII). La fraction de ces mêmes lipides, saponifiés, fait l'objet des chromatogrammes III et III', du tableau XV. Une portion de ces esters fut successivement sublimée, hydrogénée (26^b), chromatographiée sur les deux types de colonne avant et après hydrogénation (chromatogrammes V, V', VI, VI', graphique 3, tableau XVI). Tandis que les lipides récupérés par lavages du charbon fournissent les chromatogrammes IV, IV' et le tableau XVII.

Chez *Rhodymenia*, les esters hydrogénés (tableau IX, rendement en acides gras 72 %) représentent :

- phase polyester : C₁₄ 10 % - C₁₆ 36 % - C₁₈ 10 % - C₂₀ 44 %
- phase Apiezon : C₁₄ 10 % - C₁₆ 32 % - C₁₈ 9 % - C₂₀ 49 %



Signalons qu'en dehors des erreurs entraînées par le calcul, la reproductibilité des chromatographies est assurée avec un maximum d'erreur de 0,5 à 1 % pour les composés mineurs, de 0,2 à 0,3 % pour les composés majeurs.

DISCUSSION

Pour les trois algues : *Furcellaria*, *Lemanea*, *Rhodymenia* la chromatographie en phase gazeuse nous a permis d'identifier, de façon très vraisemblable les esters des acides : caprique, laurique, myristique, myristoléique, palmitique — souvent le plus abondant — palmitoléique, tandis que l'acide stéarique est minoritaire, les acides oléique et linoléique le remplacent avantageusement — et que l'acide linoléique fait généralement défaut.

De plus, dans ces trois espèces — et nous verrons plus loin chez toutes les algues étudiées — un, deux, peut-être même trois acides,

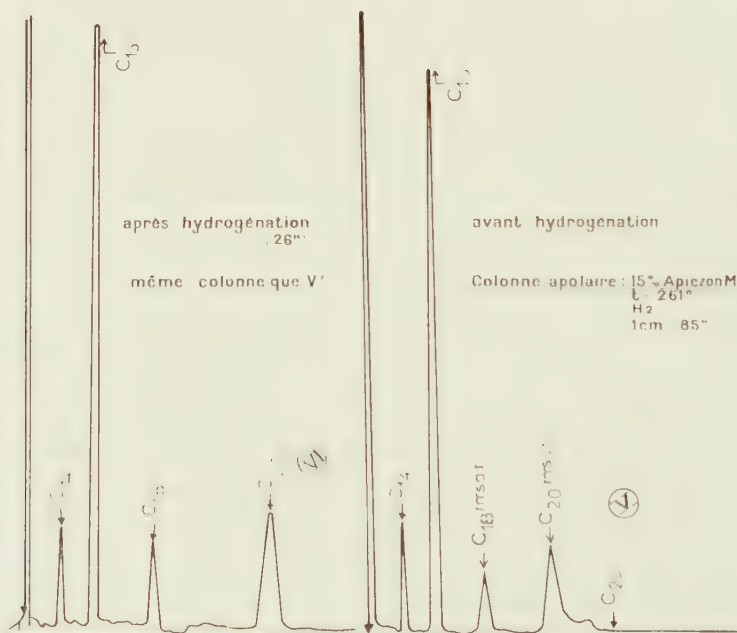
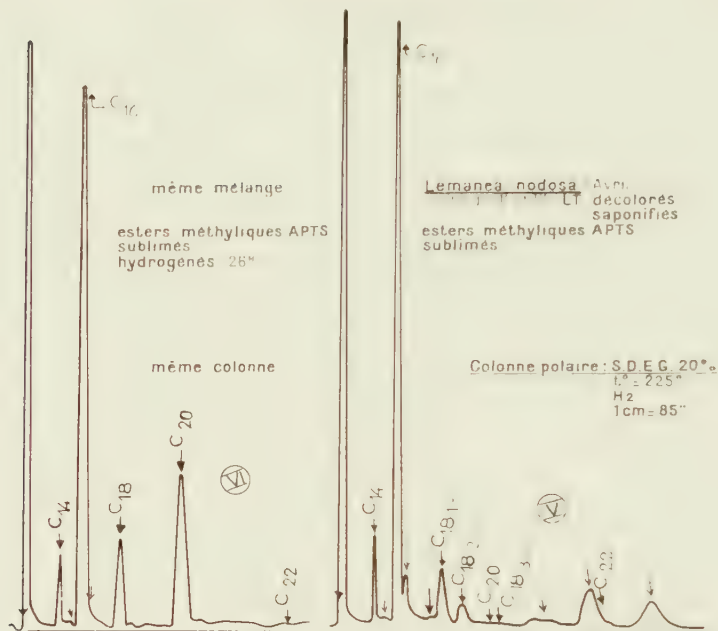
TABLEAU XV

<i>Lemanea nodosa</i> : chromatogrammes III et III'					
Colonne polaire : S.D.E.G.			Colonne apolaire : Apiezon L		
esters méthyliques d'acides témoins	Long. chaîne, ac. sat. equiv.	pour 100 des acides totaux	esters méthyl. d'acides témoins	Long. Chaîne. ac. sat. equiv.	pour 100 des acides totaux
C ₁₀ Caprate	10	< 1	C ₁₀ Caprate	< 10	trace
C ₁₂ laurate	12,3	< 1	C ₁₂ laurate	< 12	trace
C ₁₄ myristate	14,1	7	C ₁₄ myristate	13,9	7
	15,2	< 1			
	15,7	< 1	C ₁₆ palmitate	16	57
C ₁₆ palmitate	16,2	39			
	16,8	8			
C ₁₈ stéarate	18,2	9		17,7	13
" 1 = oléate	18,7	4	C ₁₈ stéarate		
" 2 = linoléate	19,4	1			
" 3 = linoléate				19,2	23
C ₂₀ arachidate			C ₂₀ arachidate		
C ₂₂ béhénate	22,3	14	C ₂₂ béhénate		
	23,2	11			

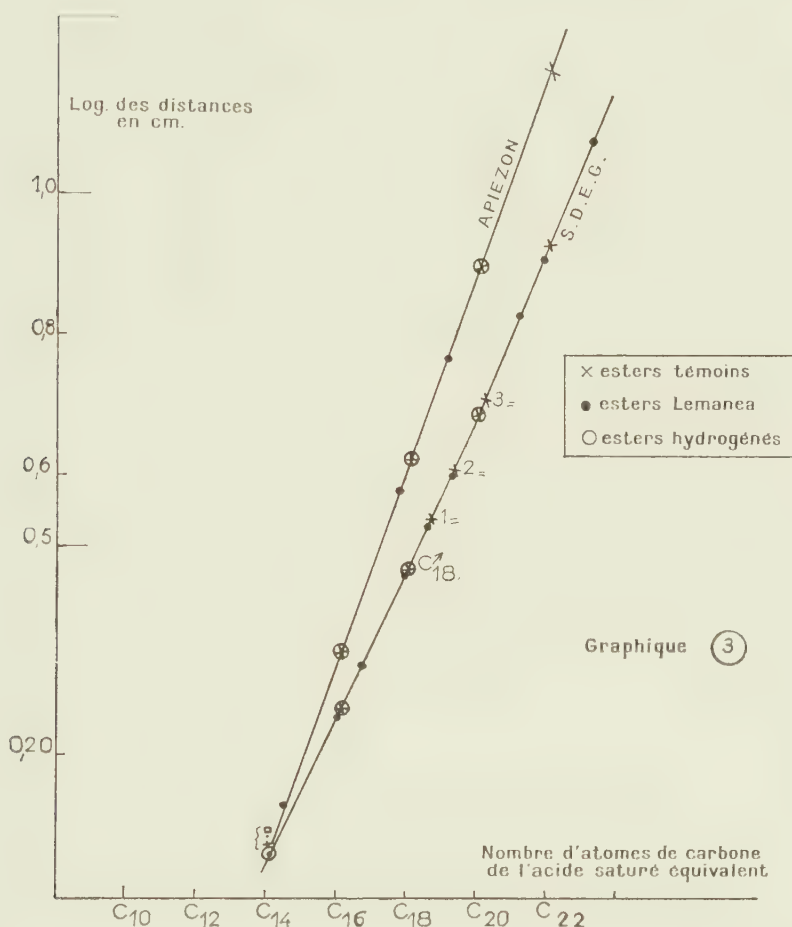
inconnus, apparaissent constamment sur tous nos chromatogrammes. Leurs caractéristiques sont les suivantes : élués sur phase stationnaire polaire au delà des acides arachidique et béhénique, ils le sont en deçà du C₂₀ sur phase stationnaire apolaire (Apiezon). Tandis qu'après hydrogénation — dont on notera au passage la courte durée et la totale efficacité — ces acides inconnus, en partie tout au moins, se comportent comme l'acide arachidique sur les deux types de colonne.

Pour *Rhodymenia*, ce ou ces acides inconnus représentent 50 % environ des acides gras totaux, 30 % chez *Lemanea*, 15 % environ chez *Furcellaria*.

Si on admet que le passage sur charbon dans les conditions adoptées (paragraphe III de ce chapitre), est une chromatographie, on peut penser que tous les lipides retenus avaient une polarité très accusée. Car leur importance — 50 % environ des lipides totaux — ne peut être attribuée aux seuls pigments. Dans ce cas



nous pourrions avancer l'hypothèse de leur appartenance aux : glycolipides, phospholipides connus chez les Rhodophycées.



Les lipides élués, par l'éther de pétrole B, en raison même des pourcentages de saponification, obtenus, appartiennent aux glycérides et sans doute même aux triglycérides. Ceux-ci seraient particulièrement riches en acides polyéthyléniques dont les nombres de carbone se répartissent entre les acides C₁₄-C₁₆-C₁₈ et surtout C₂₀; leur hydrogénation étant relativement aisée et surtout totale. Ce dernier fait tend à mettre en évidence la présence de molécules à groupement sulfoné parmi les glycolipides.

Nous verrons en effet, plus loin, que l'hydrogénation des esters obtenus par méthylation directe des lipides totaux, n'a jamais été complète.

TABLEAU XVI

<i>Lemanea nodosa</i> (LT. récupérés) chromatogrammes IV et IV'					
Colonne polaire : S.D.E.G.			Colonne apolaire : Apiezon L.		
Esters méthyl. d'acides témoins	Long. chaîne ac. sat. équiv.	pour 100 des acides totaux	Esters méthyl. d'acides témoins	Long. chaîne ac. sat. équiv.	pour 100 des acides totaux
C ₁₀ caprate	< 10	trace	C ₁₀ caprate	10	trace
C ₁₂ laurate	12,4	1	C ₁₂ laurate	12	trace
C ₁₃ myristate	14,2	7	C ₁₄ myristate	13,9	5
C ₁₆ palmitate	16,1	52	C ₁₆ palmitate	15,9	60
	16,9	8			
C ₁₈ stéarate					
	18,2	1			
" 1 = oléate	18,7	8		17,7	13
" 2 = linoléate			C ₁₈ stéarate		
" 3 = linoléate	19,1	3			
				19,25	22
C ₂₀ arachidate	20,7	3	C ₂₀ arachidate		
C ₂₂ bécénate	22,3	10	C ₂₂ bécénate		
	23,2	8			

Enfin les hypothèses sur la possibilité de groupements hydroxyle, époxy ou de chaîne ramifiée, le long de la chaîne carbonée linéaire des acides gras seront envisagés au chapitre 3.

3) SÉPARATION DES ACIDES GRAS LIBRES PAR LES RÉSINES ÉCHAN-GEUSES D'IONS.

Les indices d'acide des lipides totaux des algues sont assez élevés. L'obtention du point de neutralisation est difficile ; de plus les solutions sont très colorées. L'aide qu'apporte un PH mètre n'en augmente pas la précision. En raison de la valeur de ces indices

(moyenne pour : *Lemanea* 70 - *Rhodymenia* 50 - *Bornetia* 20) — nous avons essayé de séparer les acides gras libres, supposés res-

posables, par les résines échangeuses d'anions selon la méthode de HORNSTEIN et coll. La fixation des acides gras était plus efficace si on opérait par contact ; le passage de la solution lipidique à travers une colonne remplie par la même quantité de résine selon SAVARY et DESNUELLE, nécessitant un grand nombre de répétitions, semble moins efficace. D'autre part, HORNSTEIN montre que la récupération des acides gras fixés sur la résine, par le méthanol

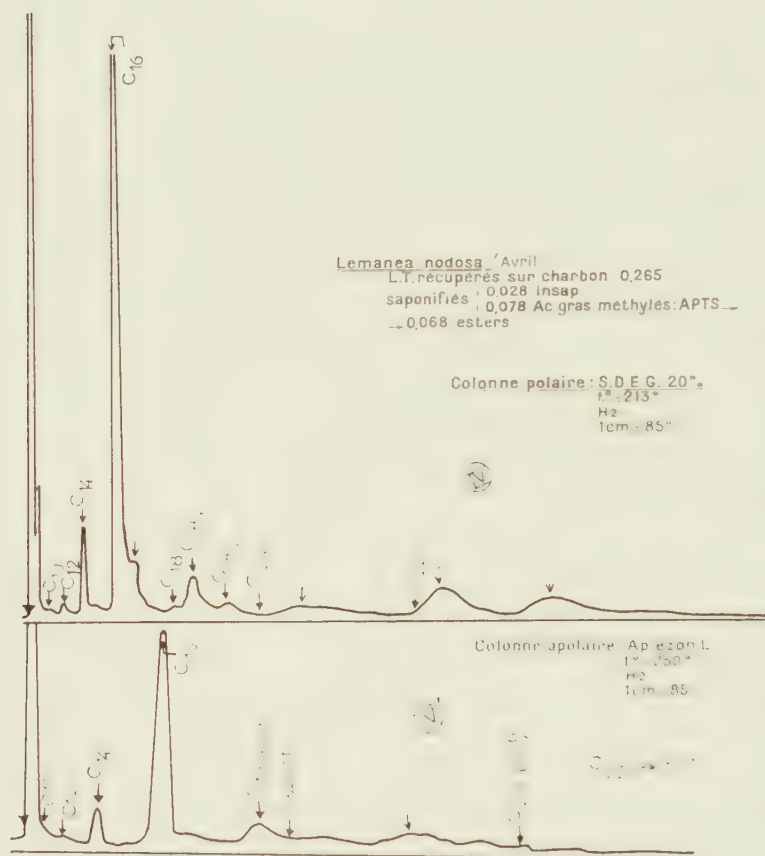
TABLEAU XVII

<i>Lemanea nodosa</i> : chromatogrammes V-V' ; VI-VI' Graphique 3									
Colonne polaire : S.D.E.G.					Colonne apolaire : Apiezon L				
Esters méthyl. d'acides témoins	Long. chaîne ac. sat. équiv.		pour 100 des acides totaux		Esters méthyl. d'ac. témoins	Long. chaîne ac. sat. équiv.		pour 100 des acides totaux	
	Avant H ₂	Après H ₂	Avant H ₂	Après H ₂		Avant H ₂	Après H ₂	Avant H ₂	Après H ₂
C ₁₄ : myristate	14	14	6	5	C ₁₄ : myristate		14		6
	14,4		trace			14,5		6	
C ₁₆ : palmitate	15,90	15,95	54	50	C ₁₆ : palmitate	16,0	16	65	51
	16,6		6						
C ₁₈ : stéarate	17,9	18,0	1	13		17,7		7	
C ₁₈ : oléate → 18,5	18,4		7						
C ₁₈ : linoléate → 19,2	19,2		3		C ₁₈ : stéarate		18		13
C ₁₈ : linolénate → 21,1	21,1								
						19,1		22	
C ₂₀ : arachidate		20,0		32	C ₂₀ arachidate		20		30
	21,2		5						
C ₂₂ : béhénate	21,8	—	10		C ₂₂ : béhénate				
	22,9	—	8						

chlorhydrique, varie de 60 à 90 % — tandis que SAVARY et DESNUELLE mettent en garde contre la présence de mono et diglycérides particulièrement instables, mais dont l'influence ne paraissait pas nuisible cependant à la bonne récupération des acides gras libérés par hydrolyses lipasiques.

Enfin EAVES et MUNDAY, OLLERO et SOTO soulignent l'importance de : la qualité des résines employées, de leurs prélavages,

de leur degré d'hydratation -- la présence d'eau empêche une bonne méthanolyse -- et du rôle que jouent au cours de leur adsorption, longueur de chaîne et insaturation des acides gras libres.



Technique.

10 grammes de résine Amberlite IRA 400 ou Duolite A-7, placés dans un erlenmeyer, sont agités pendant 10 minutes avec 25 ml d'une solution normale d'hydroxyde de sodium. Après repos, le liquide surnageant est déplacé, la résine lavée jusqu'à neutralité à l'eau distillée, puis par 3 volumes de 25 ml d'éthanol anhydre (pour certains auteurs : à 96 %), et enfin par 3 volumes de 25 ml d'éther de pétrole distillé (30-50° C).

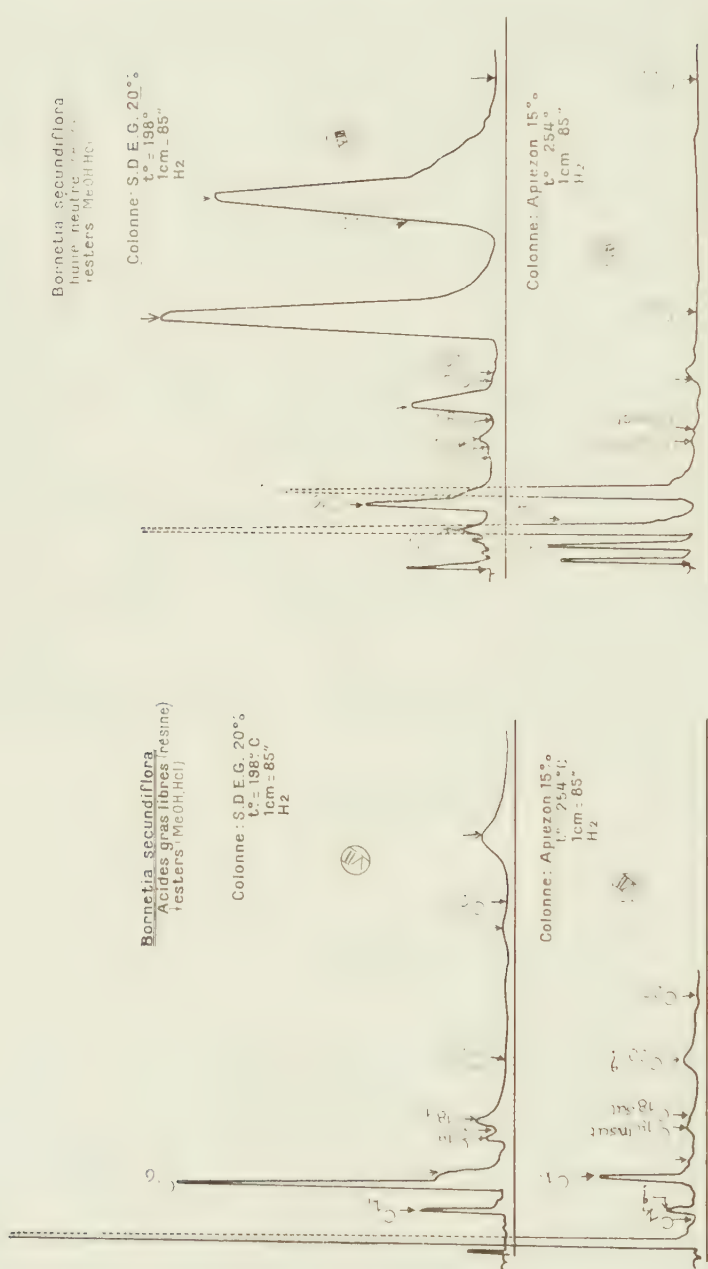
Ces 10 grammes de résine (OH⁻) sont capables, selon SAVARY et DESNUELLE, de retenir 300 mg d'acides gras libres. L'indice

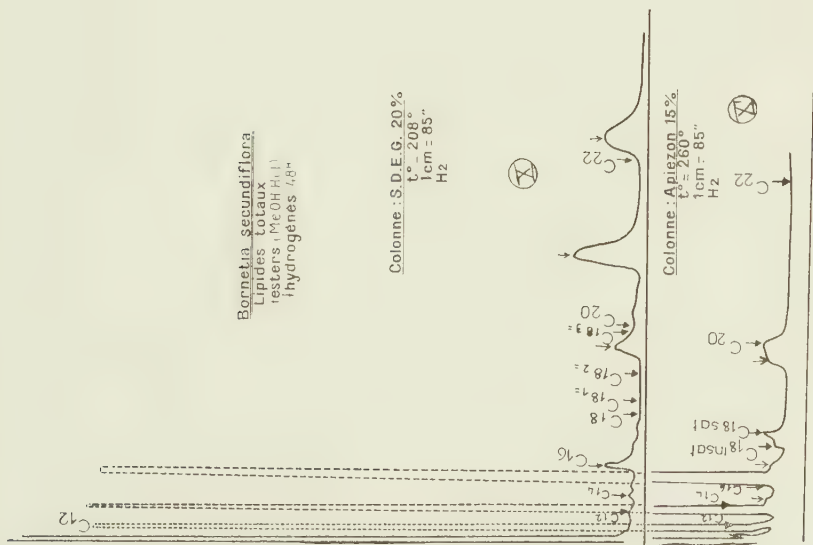
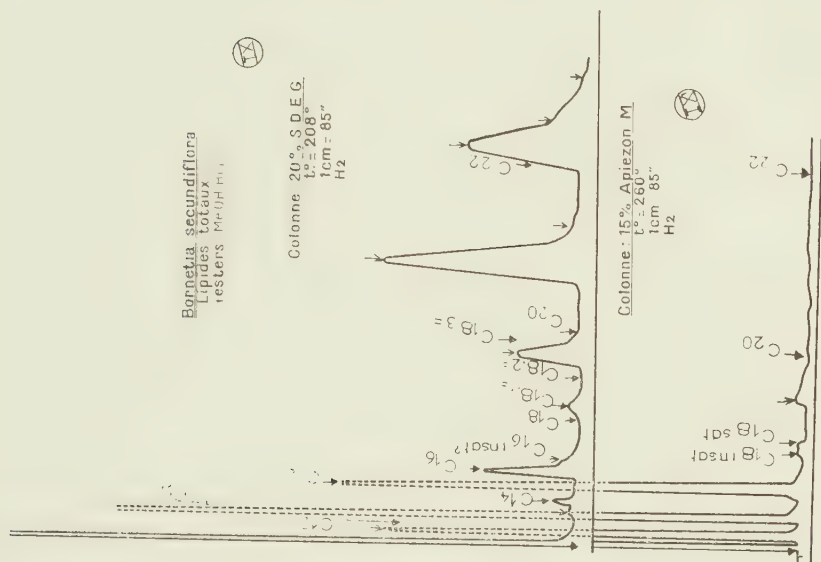
d'acidité fixe donc le poids convenable de lipides totaux à neutraliser. Leur solution, dans l'éther de pétrole, est versée dans l'erlenmeyer contenant les résines prétraitées. L'ensemble est agité pendant 25', à température inférieure à 30° C. Après filtration, (entonnoir à plaque poreuse), la résine est encore lavée et agitée trois fois avec 25 ml d'éther de pétrole. Les 4 filtrats additionnés, sont distillés à sec, sous courant d'azote, puis méthylés par la solution méthanolique à 6 % d'acide chlorhydrique gazeux, anhydre.

De cette dernière solution, on prend aussi 25 ml pour estérifier les acides gras adsorbés par la résine : en agitant pendant au moins 1 heure ($t^{\circ} < 30^{\circ}$ C). Après séparation du liquide, la résine est encore lavée 2 fois par 15 ml de solution méthanolique en agitant chaque fois pendant 15 minutes. Ces solutions méthanoliques (55 ml), comme pour celles provenant de l'estérification de l'huile neutre, sont rassemblées dans une ampoule à décantation. On leur ajoute : 10 ml d'eau distillée, 50 ml d'éther de pétrole. Le mélange est agité, laissé au repos ; la phase aqueuse inférieure, décantée dans un second entonnoir ; elle y sera épuisée deux fois par 20 ml d'éther de pétrole. Les solutions éthérées, rassemblées dans le premier entonnoir, sont lavées à l'eau distillée jusqu'à neutralité, séchées sur sulfate de sodium anhydre et concentrées à sec sous courant d'azote. Les esters méthyliques des acides gras libres, et ceux de la fraction neutre sont alors prêts pour la chromatographie en phase gazeuse.

Cette méthode a été appliquée, aux solutions lipidiques de deux algues marines :

Bornetia secundiflora
Rhodymenia palmata





Colonne polaire : 20 % S.D.E.G.					Colonne apolaire : 45 % Apiczon M								
Esters témoins	VII	VIII	IX	N (H ₂)	Esters témoins	VII'	VIII'	IX'	N' (H ₂)				
	L.C.E. %	L.E.C. %	L.C.E. %	% L.C.E. %		L.C.E. %	% L.C.E. %	% L.C.E. %	% L.C.E. %				
C ₁₄ = Myristate	14	8	11	1	13,9	1	Myristate	14	11	11,8	12	11,8	16
C ₁₆ = Palmitate	16	18	16	5	16	1	Palmitate	16,6	12	16,5	8	16,5	25
	16,6	12	16,5	< 1	16,5								1
C ₁₈ = Stéarate	18,0	5						18,5	8	18,5	< 1	18,5	1
													2
													6
C ₂₀ : Arachidate													19,5
													19,9
C ₂₂ : Béhénate	22,6	19	22,3	53	22,4	38	22,3	34					

Résultats.

Les tableaux XVIII et XIX portent les valeurs obtenues pour les fractions : acides gras libres et huile neutre, respectivement à ces deux algues.

Bornetia secundiflora.

- a) Les deux fractions : acide gras libres et huile neutre sont de constitution différente (Tableau XVIII).

La fraction acide est plus pauvre en C_{14} que la fraction neutre. La fraction acide est plus riche en C_{16} que la fraction neutre. La fraction acide est plus riche aussi en C_{20} insaturés que la fraction neutre (d'après les chromatographies sur colonne apolaire).

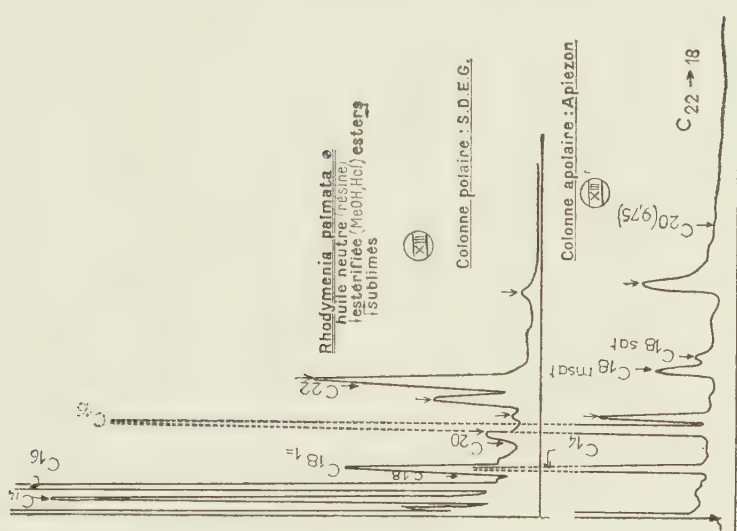
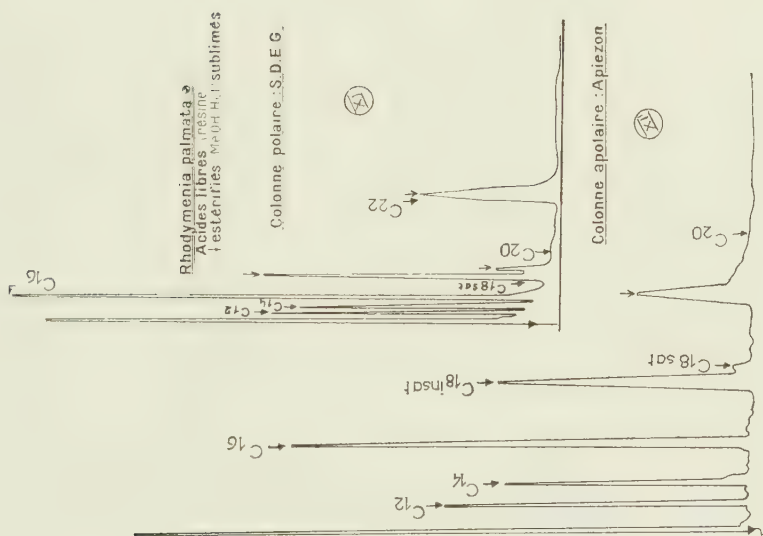
Donc nous pensons que ces acides libres, fortement insaturés ne proviennent pas de l'hydrolyse enzymatique des glycérides, ceux-ci étant de composition différente.

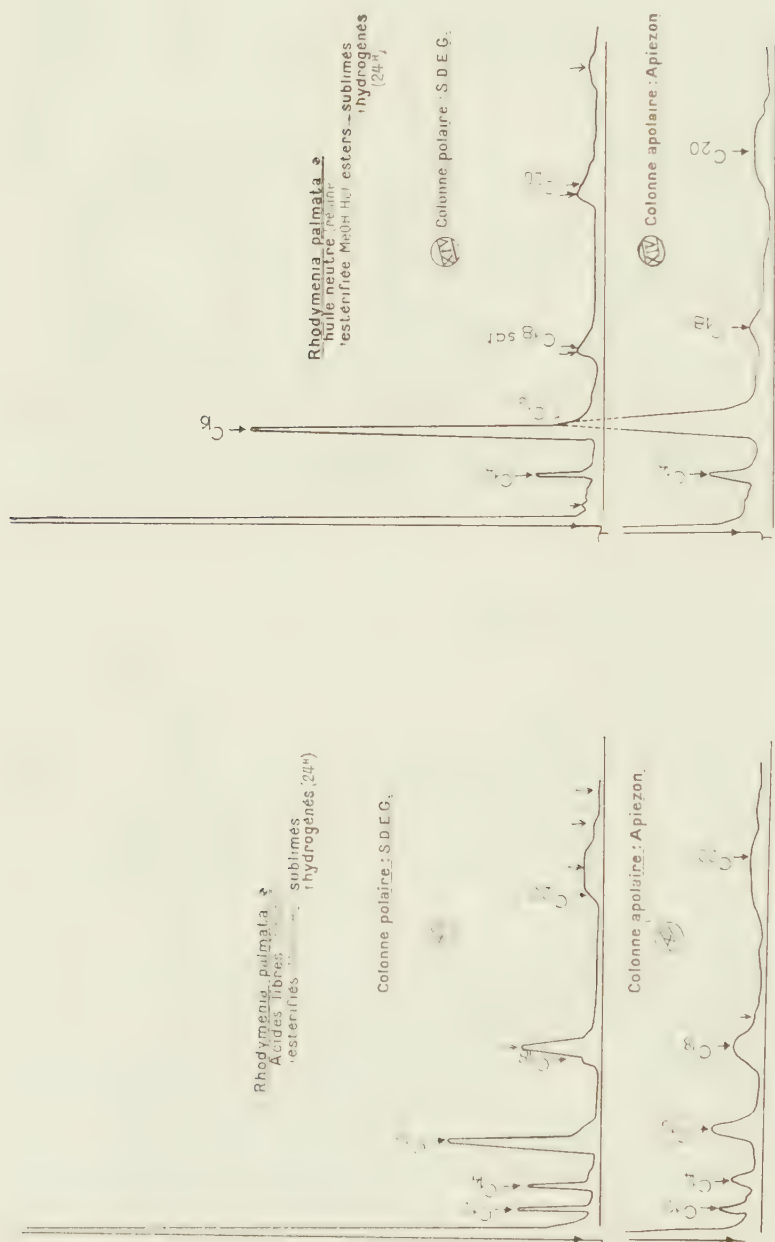
- b) Les acides gras totaux (estérification des lipides totaux) fournissent des courbes de même allure que celles des acides gras de l'huile neutre par chromatographie en phase gazeuse (VIII et IX).

Rhodymenia palmata (Tableau XIX).

- a) Les fractions acide et neutre présentent les caractères suivants :
 — les esters en C_{14} sont en quantités approximativement égales ;
 — les esters C_{16} sont en quantité plus importante dans la fraction neutre ;
 les esters en C_{18} sont prépondérants dans la fraction acide.
- b) Les esters en C_{16} saturé, C_{20} insaturés surtout l'emportent en quantités sur les autres, mais nous n'avons pas décelé d'acide en C_{22} , — ou seulement, à l'état de trace si on augmente démesurément le volume d'injection, ce qui infirme les résultats antérieurs de LOVERN, concernant cette même algue.

Nous avons aussi constaté pour les algues ci-dessus : que le mode de méthylation de leurs acides gras influe sur les rendements chromatographiques. Or l'expérience et la théorie ont montré que, quel que soit le catalyseur employé (HCL, SO_4H_2 , APTS, etc...), la méthylation d'acides gras témoins purs fournissait des éluations chromatographiques parfaitement reproductibles. que l'hydrogénation totale de ces esters d'algues restait incomplète malgré des temps prolongés (96 heures) et cela précisément, quand ces esters provenaient de lipides bruts ou totaux non décolorés, ou insuffisamment lors de leur blanchiment par le charbon.





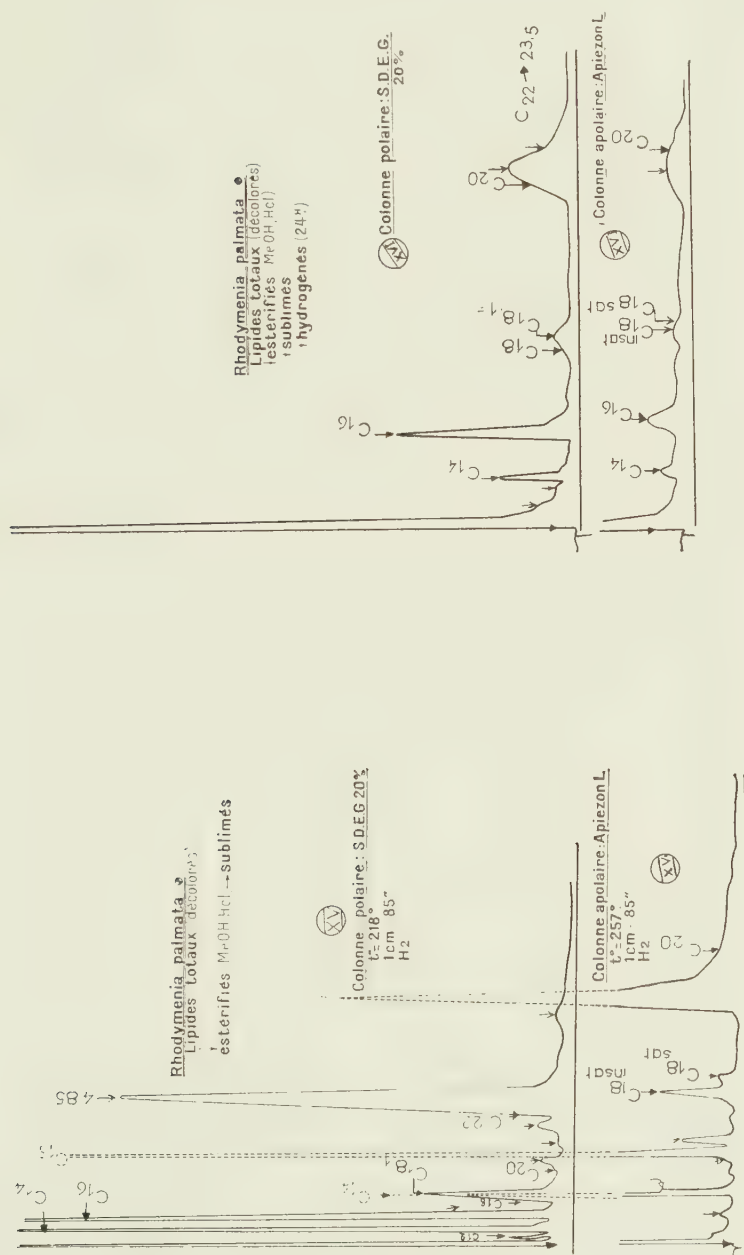


TABLEAU XIX

XIX-A

<i>Rhodospira palmata</i> : 1500 g. d'algues fraîches → 3,899 g. de Lipides totaux décolorés (alcool de fixation) (tétraspores)						
Indice d'acide	Poids de lipides totaux	Traitement	Poids recueillis	Extraction Sublimation	Numéro des chromatogr. S.D.E.G. APIEZON	
53	0,114	Résine IRA 400 (OH ⁻)	0,097 huile neutre ↗	$\left\{ \begin{array}{l} 0,131 \rightarrow 0,072 \\ 0,033 \rightarrow 0,038 \end{array} \right.$	Rdt	H ₂
56	0,081	Résine IRA 400 (OH ⁻)	0,075 huile neutre ↗	53 %	XIII	XIV
			0,033 acides libres ↗	>100	XI	XI
0,107		Transeslérines	0,107 → 0,080	0,002	XX	XX
				67 %	XX	XX

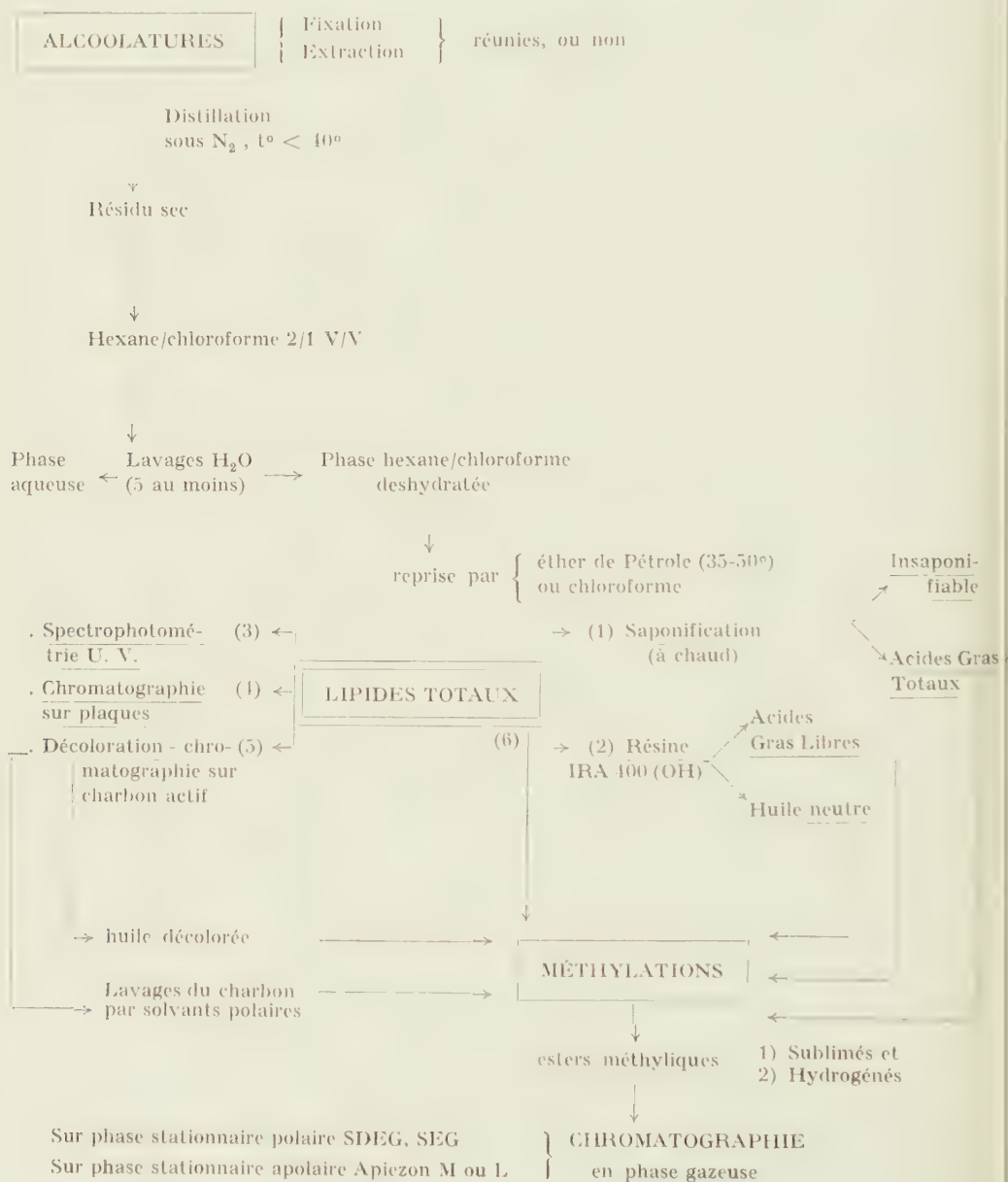
Phase stationnaire polaire : S.D.F.G. 20%										Phase stationnaire apolaire : Apiezon L 15%									
Esters témoins		Avant hydrogénation					Après hydrogénation (2 ^h)			Esters témoins		Avant hydrogénation					Après hydrogénation (2 ^h)		
E.L.C.																			
	% I	% XIII	% XV	% XII	% XIV	% XVI				NI	% NIIF	% NV	%	NIIF	% NIV	% XVI	%		
C ₁₂	11,9	6	11,9	1	12	5				C ₁₂	12	9	—	12	<1	12	8		
C ₁₄	14	11,4	11,4	11,4	9,4	10				C ₁₄	14	10,4	4	14	13,4	7,4	13,4		
C ₁₆	16	27,16	40,16	18,16	30,16	31				C ₁₆	16	32,16	47,16	25	16	27,16	61,16		
			16,3	4								16,5	8	16,5	3				
C ₁₈	18,3	27,18,3	12	18,3	7,18	7				C ₁₈ =	17,6	28	17,6	6	17,6	7			
	18,6	4		18,3	28	18,3				C ₁₈	18	3	18	3	18	2	18		
						19,9	13							18,2	3				
C ₂₀		20,4	3	20,4	1	20,3	24				19,1	18	19,1	22	13,3	5,0			
		21,0	<1			20,6	5	20,4	8					20	29	20			
		21,4	7	21,4	2											19,6	63		
C ₂₂	22,4	25	22,5	22	22,8	54													
		24,0	3	24,2	2														
										E.L.C. = équivalent (en acide saturé) de longueur de chaîne. % des acides totaux.									

E.L.C. = équivalent (en acide saturé) de longueur de chaîne.
% des acides totaux.

Avant hydrogénation				Après hydrogénation (2 ^h)			
NI	% NIH	% XV	%	NIH	% NIH	% XVI	%
12	9	—	<12	8	—	—	—
14	10	14	14	7	14	13	14
16	32	16	47	16	27	16	22
	16,5	8	16,5	3			
17,6	28	17,6	6	17,6	7		
18	3	18	3	18	26	18	8
19,1	18	19,1	22	19,3	3	19,6	63
			20	29	20	18	20

TABLEAU XX

Méthodes d'analyse chimique, des Lipides de Rhodophycées — (Chapitres II et III).



CHAPITRE III

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES VARIATIONS DES ACIDES GRAS TOTAUX DES RHODOPHYCÉES

D'après les précédents résultats, l'influence du facteur écologique paraît peu marquée quant aux acides gras de ces algues. Nous envisagerons alors l'étude de leurs variations sous les angles suivants :

- I) variations en fonction des espèces ;
- II) variations en fonction de la reproduction.

I. — VARIATIONS EN FONCTION DES ESPÈCES

Les résultats portés au tableau XXI sont relatifs aux valeurs rapportées à 100 des acides gras totaux. Tous ces acides ont d'abord été obtenus par saponification, puis méthylés (catalyseurs : 2 % acide paratoluène sulfonique, ou acide chlorhydrique anhydre 6 %, ou encore acide sulfurique 2 % dans le méthanol anhydre). Sur les sept algues, les esters méthyliques, concernant seulement quatre d'entre elles, ont été hydrogénés. Les quantités d'esters fournies par *Furcellaria*, *Bornetia*, *Polysiphonia* ne permettaient pas le prélèvement des parties à hydrogéner. Dans les quatre autres cas, les temps (2 heures, 24 heures, 48 heures, etc...) n'ont jamais permis la saturation complète des esters, supposés seulement à liaisons éthyléniques.

Cependant, la chromatographie, antérieure à toute analyse, d'esters d'acides gras témoins purs et connus, nous assurait d'une réponse satisfaisante du détecteur, à leur injection.

Résultats.

Considérant les valeurs indiquées au tableau XXI nous pouvons dire qu'aux variations de pourcentages près, toutes les algues contiennent les mêmes produits.

De plus, nous dirons que les esters méthyliques obtenus à partir de ces algues se comportent :

TABLEAU XXI

esters méthyliques d'acides gras témoins en :	algues dulçaquicoles					
	Sacheria fucina (Avr)			Lemanea nodosa (Avr)		
Colonne S D E G	(esters APTS)			(APTS)		
	ELC	%	H ₂ (24°)	ELC	%	H ₂ (24°)
C ₁₀ = caprate	9,8	1	10	5		
C ₁₂ = laurate	11,8	6	12	4		
C ₁₄ = myristate	13,8	12	14	7	14	5
	14,5	2				
C ₁₆ = palmitate	15,8	22	16	12	16	50
	16,3	18	16,2	12	15,5	6
C ₁₈ = stéarate	18,1	16	18	7	18	6
C ₁₈ = oléate	18,5	5	18,4	15	18,5	10
C ₁₈ = linoléate	19,1	1		19,1	4	
C ₁₈ = linoléate						
C ₂₀ = arachidate					20	13
	20,6	7	20,4	8	20,3	22
C ₂₂ = behénate	21,7	3		21,8	16	
	22,3	5				
				23	14	

* E.L.C. = équivalent (en acide saturé) de longueur de chaîne

algues				marines					
Gelidium sesquipedale (SE)		Furcellaria pastigiata (SE)		Rhodymenia palmata ♂		Bornetia Secundiflora		Polysiphonia elongata (SE)	
(SOLV)		(APTS)		(APTS)		(HCL)		(APTS)	
ELC. %	* H ² % (48°)	ELC. %		ELC. %	* H ² % (2°)	ELC. %		ELC. %	
		10	< 1					10,5	< 1
12,4	3	11,8	2			12	1	12	1
14	5	13,6	2	14	10	14	7	14	4
14,3	< 1	13,8	5						
		14,4	2						
		14,8	2						
16	44	15,9	32	16	32	16	43	16	45
16,7	1	16,2	14	16,6	5			16,6	10
		17	4						
18	1	17,8	3	18	2	18	2	18	2
18,5	12	18,5	11	18,5	8	18,5	8	18,5	5
	18,7	13							
19,25	1	19,0	3					19	2
	19,4	9							
		19,8	1						
	20,05	20,1	< 1	20	2	20	1		
	20,25	7		20,4	16				
				20,7	28	20,8	3		
21,5	17	21,6	6			21,7	3	22	2
		22,25	12			22,2	3		
22,5	14							22,5	26
				23	42				

% = pour cent des acides totaux

- à peu près comme les esters témoins d'acides gras en C_{10} et C_{12} pour des quantités généralement inférieures à 6 %.
- Les esters en C_{14} représentent moins de 10 %.
- Ceux en C_{16} sont largement prépondérants 40 à 50%, sauf chez *Rhodymenia* où les taux varient de 30 à 40 %.
- La teneur en pseudo-stéarate est largement dépassée par celle en oléate ; peu de linoléate et généralement pas de linolénate.
- Enfin deux pics importants, souvent accompagnés d'un troisième moindre, émergent au delà des esters en C_{20} et en C_{22} représentant :
 - moins de 20 % : chez *Sacheria fucina*, *Furcellaria fastigiata*,
 - moins de 30 % : chez *Lemanea nodosa*, *Polysiphonia elongata*,
 - moins de 40 % : chez *Gelidium sesquipedale*, *Bornetia secundiflora*,
 - à peu près 50 % : chez *Rhodymenia palmata*.

Alors que sur colonne apolaire ces corps sont élués avant l'arachidate de méthyle, et comme ce dernier si l'hydrogénation est complète.

Que peut-on dire de la nature des acides gras des algues ? Grâce aux analyses portant sur des esters d'acides connus (MIWA, ACKMANN, LEFORT) il ne semble pas possible de rattacher nos inconnus aux acides hydroxylés et monoinsaturés de type acides ricinoléiques, par exemple, ces derniers émergeant, par chromatographie (phase polyester) au-delà du C_{25} ; les nôtres dans ce cas émergent légèrement au-delà du C_{22} (béhénate). Mais la comparaison des comportements chromatographiques (phase gazeuse) des esters d'acides purs polyinsaturés en C_{20} et C_{22} (de 2 à 5 doubles liaisons) impossibles à obtenir, vient de trouver son épilogue dans un article récemment paru (1961) de HORNING et collaborateurs. Ces auteurs relatant leurs travaux, expriment les acides insaturés en longueur de chaîne acide saturé, équivalente (table 5, p. 210), tant pour les acides C_{16} (1 =), C_{18} (de 1 à 3 =) que C_{20} (1 à 4 =).

Pour les insaturés, homologues de l'arachidate, en particulier nous trouvons, sur les deux types de colonne, (en équivalent de chaîne saturée) des valeurs très proches, sinon identiques à celles obtenues avec les esters d'algues.

L'identification de nos acides gras est donc suffisamment précise, en ce qui nous concerne. Nous laisserons au chimiste le soin de la rendre indubitable.

II. — VARIATIONS EN FONCTION DE LA REPRODUCTION

Elles ont été enregistrées à propos de deux algues :

Lemanea nodosa

Rhodymenia palmata

Mais il faut tenir compte des faits suivants : si chez *Lemanea* il est possible de suivre le développement des appareils reproducteurs depuis la gamétogénèse jusqu'à l'expulsion des carpospores parallèle à l'émiettement du thalle, il paraît à l'heure actuelle impossible, d'essayer du point de vue chimique de connaître la composition lipidique des appareils végétatifs du *Chantransia* (cf. chapitre 1^{er}) en raison de sa petite taille et de son environnement dense de Diatomées, Cyanophycées, etc...

Pour *Rhodymenia*, on peut, aux époques favorables, obtenir les tétrasporophytes, les gamétophytes mâles, et les plantes stériles mais on ne connaît pas encore aujourd'hui le gamétophyte femelle.

Il faut noter aussi que nombreuses sont les algues marines épiphytes et que les lieux ou plus exactement la latitude, et les conditions climatiques (t°, etc...) influent sur les époques de fructification. Ainsi à Roscoff les *Bornetia* sont toujours stériles, mais fructifient à Biarritz en septembre-octobre (J. FELDMANN, 1954).

Enfin la saison estivale, marque l'envahissement des Rhodophycées par les parasites animaux ou végétaux, rendant alors leurs récoltes plus difficiles et même inutiles !

Résultats.

Le tableau XXII signale les pourcentages des acides gras totaux relatifs des deux algues : *Lemanea* et *Rhodymenia*. Les esters étant obtenus par méthylation directe (HCL 5 %) des lipides totaux, sublimation, et hydrogénation parallèle des aliquotes.

Chez *Lemanea*, on remarquera que la maturation des carposporocystes entraîne : un enrichissement progressif en palmitate, un appauvrissement correspondant en esters polyinsaturés C₂₀ ; résultats confirmés par ceux obtenus sur colonne apolaire.

Chez *Rhodymenia*, les tétrasporophytes sont légèrement plus riches en palmitate ; quant aux esters poly-insaturés ils ont à peu près les mêmes valeurs tant pour les tétrasporophytes que les gamétophytes mâles.

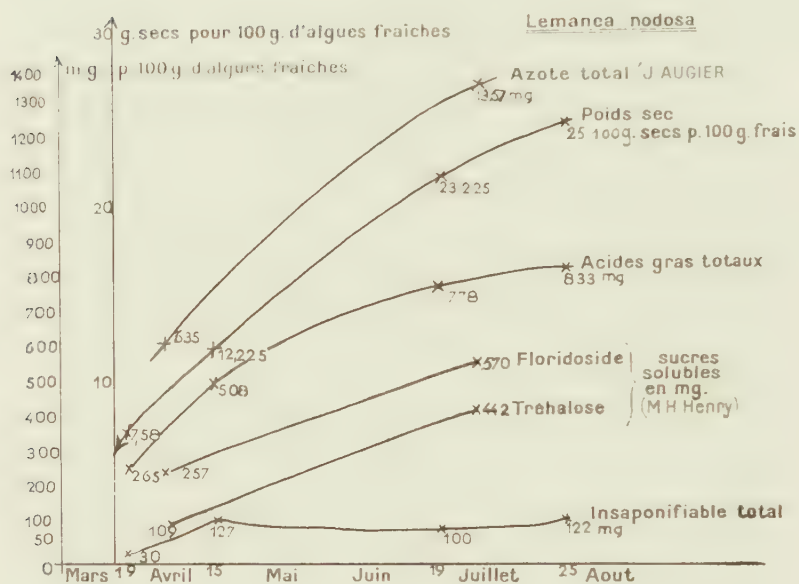
Mais l'hydrogénation totale de ces esters est si difficile qu'il me paraît souhaitable de débarrasser préalablement les lipides totaux de toute trace de sulfolipides (glycolipide prédominant des Rhodophytes selon SHIBUYA), le soufre étant on le sait « l'empoisonneur » le plus actif des catalyseurs d'hydrogénation.

TABLEAU XXII

esters méthyliques d'acides gras témoins en:	Lemanea nodosa Avril				Lemanea nodosa Juin			
	S. D. E. G				S. D. E. G			
	S. D. E. G				S. D. E. G			
	ELC	%	$\frac{100}{\%}$	$\frac{100}{\%}$	ELC	%	$\frac{100}{\%}$	$\frac{100}{\%}$
C ₁₀ ou caprate								
C ₁₂ ou laurate		12		1				
	12,9	1						
	19,6	4						
C ₁₄ ou myristate		14		3	13,7	2		
				14	14,2	5	14	0
C ₁₆ ou palmitate	16	96	16	31	16	41	16	51
	16,4	2			16,4	2	16,4	5
C ₁₈ ou stéarate		18		2				
	18,85	6	18,25	7	18,25	4		
C ₁₈ ou oléate		18,6		4				
				18,6	18,7	17	18,6	18
C ₁₈ ou linoléate	18,8	2						
	18,15	2			18,15	2		
C ₁₈ ou linoléate								
C ₂₀ ou arachidate		20,5		2				
	20,6	9						
	21,7	16			21	5	21	4
C ₂₂ ou béhénate		22		5	21,7	15	21,5	14
	22,5	22			22,5	6	22,5	6
					23	5		

Lemanea nodosa Juillet				Rhodymenia O				palmata ⊕ (tétraspore)			
S.E.G.				S.D.E.G.				S.D.E.G.			
E.L.C.	%	H ₂ (24°)	%	E.L.C.	%	H ₂ (24°)	%	E.L.C.	%	H ₂ (24°)	%
10	< 1%										
				12	1			12	< 1		
						13	< 1				
14	5	13,5	7			14	10	14	11	14	11
				14,4	7						
15,8	28	13,5	62			16	23	16	18	16	3,1
16,1	2	20	5	10,5	21	16,6	2	16,4	4		
				16,9	1						
				18,2	< 1	18,2	< 1			18,25	7
						18,6	3	18,5	6		
18,75	43	18,5	16	18,8	3						
19,1	2										
				20	8	19,8	4				
								20,2	3	20,1	4,4
20,8	5	20,6	6							20,6	8
				21,6	24	21,6	26				
22,2	12	22	2								
				22,9	15	22,9	19	22,7	54		
23	2			23,4	20	23,2	12	23,1	3		

TABLEAU XXIII



Le tableau XXIII rapporte, pour *Lemanea nodosa*, les variations observées depuis la gamétogénèse (mars) jusqu'à la pleine maturité des carpospores et correspondant aux poids secs, acides gras et insaponifiable totaux, azote, et sucres solubles — floridoside et tréhalose, — toutes ces valeurs étant ramenées à 100 grammes d'algues fraîches (AUGIER, 1934, HENRY, 1949).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Par le concours des méthodes de recherche appartenant aux divers domaines : histochimie, chimie organique (techniques classiques et récentes) tous nos résultats convergent pour établir l'existence de substances à caractères lipidiques chez les Algues Rouges.

Ces lipides appartiennent à deux catégories différentes et inhérents à leurs rôles physiologiques : les lipides polaires (galacto et phospholipides divers) relevant directement du métabolisme photo-synthétique et de la structure cellulaire donc toujours présents dans ces tissus végétaux ; les lipides peu polaires ou de réserve, fournis et utilisés par des organes spéciaux assurant la pérennité de l'espèce.

Du point de vue de la cytologie, les colorations obtenues dans le cytoplasme des *Lemanea*, grâce aux divers « bleus » (de Nil, de méthylène, B.Z.L.), les réactions de Nadi et de Schiff, les colorations au rouge et noir Soudan, établissent l'existence d'inclusions formées d'acides gras insaturés. Ces inclusions très abondantes dans les carposporocystes mûrissants s'accumulent conjointement aux plages amylicées colorables au Lugol.

Les tests de SMITH-DIÉTRICH et de BAKER établissent que les phospholipides ne sont pas accumulés dans ces mêmes conditions, au titre de réserves.

Du point de vue macrochimique, partie principale du présent travail, nous avons réuni tous les détails précis rendus accessibles par les techniques actuelles, compte tenu de la quantité minime de produits purifiés dont il est possible de disposer.

L'ensemble des lipides a été extrait des algues suivantes : *Lemanea nodosa*, *Sacheria fucina*, *Gelidium sesquipedale*, *Furcellaria fastigiata*, *Polysiphonia elongata*, *Bornetia secundiflora*. Les meilleurs rendements en lipides ont été obtenus par lixiviations, à l'alcool fort, des poudres d'algues dans l'appareil de Kumagawa. Les extraits alcooliques sont évaporés sous courant d'azote et à basse température. Les corps liposolubles sont alors séparés par un mélange hexane-chloroforme (2/1, V/V) largement et minutieusement lavé à l'eau.

La décoloration par le charbon actif est indispensable mais à

la dose efficace, qui est relativement élevée, le charbon adsorbe une proportion importante jusqu'à 50% des substances dissoutes.

Les mesures effectuées, montrent les algues fructifiées notablement plus riches que les thalles jeunes ou non sporulés, la teneur en lipides totaux étant toujours peu élevée. Les taux de lipides bruts exprimés en grammes pour 100 grammes d'algues fraîches sont respectivement de :

0,169 pour	<i>Sacheria fucina</i>	} algues non fructifiées
0,142 pour	<i>Furcellaria fastigiata</i>	
0,172 pour	<i>Polysiphonia elongata</i>	
0,633 pour	<i>Gelidium sesquipedale</i>	} algues en cours de gamétogénèse
0,677 pour	<i>Bornetia secundiflora</i>	

Variant de 0,661 à 1,108 au cours de la sporogénèse de *Lemanea nodosa*,

de 0,434 à 0,624 au cours de la gamétogénèse de *Rhodymenia palmata*.

L'analyse des lipides a été conduite pour le reste comme l'indique le tableau XX.

Retenons ici l'essentiel des résultats :

1° la chromatographie sur couche mince d'acide silicique permet, avec les éluants appropriés, une très bonne séparation des composants des lipides totaux. Les lipides polaires restent au niveau de la ligne de dépôt des taches. Les triglycérides d'acides insaturés se placent directement en-dessous de la ligne frontale, occupée principalement par les hydrocarbures. Des tests colorés plus spécifiques rendent probables l'identification des stérols, acides gras libres et autres glycérides.

2° Les dosages du phosphore mettent en évidence la pauvreté en phosphore lipidique, ce qui confirme les résultats histochimiques. Les variations de la teneur en phosphore total paraissent tenir à l'espèce et aussi à son état physiologique. Les chiffres obtenus montrent une bonne concordance avec ceux publiés par d'autres auteurs.

3° La détermination la plus précise possible des acides gras, est fournie par la chromatographie en phase gazeuse de leurs esters méthyliques. Si ces derniers proviennent de l'estérification des lipides totaux leur hydrogénation est toujours incomplète. Alors que de très bonnes résolutions chromatographiques sont données par des esters provenant des fractions triglycéridiques séparées, avant et après hydrogénation totale.

Nous pouvons affirmer que toutes les algues mentionnées contiennent les mêmes produits, à des taux différents toutefois.

Leurs esters méthyliques se comportent à peu près, comme les esters témoins d'acides gras en C_{10} et C_{12} pour des quantités généralement inférieures à 6%.

— Ceux en C_{14} représentent moins de 10%.

— Les esters en C_{16} largement majoritaires : 40 à 50% en général sauf pour *Rhodymenia* où ils représentent seulement 30 à 40% des acides totaux.

— peu d'esters en C_{18} saturé, di et tri insaturés, mais plus d'oléate.

— enfin des produits émergeant au-delà des témoins saturés en C_{20} et C_{22} représentent :

moins de 20% pour	{	<i>Sacheria fucina</i>
	{	<i>Furcellaria fastigiata</i>
moins de 30% pour	{	<i>Lemanea nodosa</i>
	{	<i>Polysiphonia elongata</i>
moins de 40% pour	{	<i>Gelidium sesquipedale</i>
	{	<i>Bornetia secundiflora</i> .
environ 50% pour		<i>Rhodymenia palmata</i> .

Notons de plus que sur colonne apolaire, ces mêmes corps sont élués avant l'arachidate de méthyle et comme lui, si leur hydrogénation est totale. Des données analytiques récentes nous autorisent à rattacher ces acides gras aux acides polyinsaturés en C_{20} , de deux à quatre doubles liaisons.

Au moment de la reproduction, gamétogénèse et sporogénèse, les acides saturés s'enrichissent, principalement en palmitate au détriment, semble-t-il, des acides polyinsaturés à 20 atomes de carbone. Ces faits sont confirmés par une chute importante de la valeur des indices d'iode des acides gras totaux (tableau XII).

4° Le taux en insaponifiable des Rhodophycées est nettement plus élevé (de 5 à 10%) que chez les plantes supérieures (de 0,1 à 1% des lipides totaux, généralement).

5° Les stérols libres l'emportent en quantité, sur les stérides ou esters de stérols.

Aujourd'hui, grâce aux techniques analytiques modernes, les lipides végétaux prouvent la complexité de leurs composants : acides gras époxydés, hydroxylés, ramifiés et cela non seulement pour les espèces Phanérogames (Crucifères, Composées, etc...) mais aussi parmi les Cryptogames (Champignons du genre *Puccinia*, bactéries, etc...). Les données énoncées ci-dessus font donc ressortir à la fois l'originalité des Rhodophycées et leur homogénéité quant aux réserves lipidiques qui s'avèrent n'être ici que des glycérides mixtes d'acides gras polyinsaturés. Tandis qu'une extrême

pauvreté en acide linolénique fait penser que les glycolipides des algues étudiées diffèrent beaucoup de ceux des plantes supérieures (Trèfle, haricot, etc...) quant aux molécules d'acides gras constitutifs.

En conséquence, au delà des résultats qui paraissent acquis par notre étude, il reste encore beaucoup à connaître : identification chimique des différents acides gras, genèse des lipides de réserve, extension de ces recherches à d'autres algues appartenant à d'autres familles et embranchements ; l'identification des stérols et des autres composés de l'insaponifiable restent à définir, et pourraient alors assurer la position systématique de nombreuses espèces de Rhodophycées.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKMAN (R.G.) and BURGMER (R.D.). — A proposed basis for the systematic identification of Unsaturated fatty acid esters through gas-liquid chromatography on polyester substrates. *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 185.
- AEBI (A.), ASSELINEAU (J.) et LEDERER (E.). — Sur les lipides de la souche humaine « Brévannes » de *Mycobacterium tuberculosis*. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, **35**, 661.
- ANDRÉ (E.). — La trilogie des acides gras insaturés : oléique, linoléique, linolénique. Histoire, formules de constitution. Etat naturel et usages. *Rev. Fr. Corps gras*, 1961, 421.
- AUGIER (J.). — Constitution et biologie des Rhodophycées d'eau douce. Thèse Paris 1934 et *Rev. Algol.* 1936, VII, 237.
- AUGIER (J.). — Les Glucides et la systématique des Rhodophycées. *C.R. Acad. Sc.* 1947, **224**, 1654.
- AUGIER (J.). — La constitution chimique de quelques Floridées Rhodomélacées. *Rev. Gén. Bot.* 1953, **60**, 257.
- AUGIER (J.) et DU MÉRAC (M.L.). — Les sucres solubles des Rhodophycées. *C.R. Acad. Sc.*, 1954, **238**, 387.
- BAILEY (R.W.). — Colour reaction between sugars and diphenylamine-urea and diphenylamine-p. anisidine on paper chromatograms. *J. Chromatog.* 1962, **8**, 57.
- BENSON (A.A.) and MARUO (B.). — Plant phospholipids. I. Identification of the phosphatidyl glycerols. *Biochim. Biophys. Acta* 1958, **27**, 189.
- BENSON (A.A.), DANIEL (H.) and WISER (R.). — A sulfolipid in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1959, **45**, 1582.
- BENSON (A.A.), WINTERMANS (J.-F.) and WISER (R.). — Chloroplast lipids as carbohydrate reservoirs. *Plant Physiol.* 1959, **34**, 315.
- BENSON (A.A.) and SHIBUYA (I.). — Surfactant Lipids in « Physiology and Biochemistry of Algae » 1962, p. 371. Ralph A. Lewin Edit. *Academic Press*, New-York - London.
- BENSON (A.A.). — Chloroplast lipid metabolism. « Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry » 1963, VI, 341. Pergamon Press Edit.
- BENSON (A.A.). — Plant membrane lipids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1964, 15.
- BIDWELL (R.G.S.). — Photosynthesis and metabolism of marine algae II A survey of rates and products of Photosynthesis in $C^{14}O_2$. *Can. J. Bot.* 1958, **6**, 337.
- BUCHANAN (J.G.), DEKKER (C.A.) and LONG (A.G.). — The detection of glycosides and non-reducing carbohydrates derivatives in paper partition chromatography. *J. Chem. Soc.* 1950, **4**, 3162.

- CAHN (T.M.), HOUGET (J.) et AGID (R.). — Sur les phospholipides des tissus animaux et les substances phosphoriques qui les accompagne. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1949, **31**, 766.
- CARTER (M.-E.), MC CLUER (R.-H.) and SLIFER (E.D.). — Wheat flour lipids. I. *J. Am. Chem. Soc.* 1956, **78**, 3785. II. *J. Lipid Research* 1961, **2**, 215. III. *J. Lipid Research* 1961, **2**, 223.
- CARTER (P.W.), HEILBRON (I.M.), and LYTHGOE (B.). — The lipochromes and sterols of the Algal classes. *Proc. Roy. Soc.* 1939, B **128**, 82.
- GASTRO RAMOS (R. de). — Las tierras de Diatomeas. *Grasas y Aceites*, 1962, **13**, 134.
- CELAN (M.). — Recherches cytologiques sur les Algues Rouges. Thèse Paris 1940.
- CHADEFAUD (M.). — Les végétaux non vasculaires. Tome I. Traité de Botanique systématique par M. CHADEFAUD et L. EMBERGER 1960. Masson Edit. Paris.
- COLIN (H.), et GUÉGEN (E.). — Le sucre des Floridées. *C.R. Acad. Sc.* 1930, **190**, 653.
- COLIN (H.) et GUÉGUEN (E.). — La constitution du principe sucré de *Rhodymenia palmata*. *C.R. Acad. Sc.* 1930, **191**, 163.
- COLIN (H.) et GUÉGUEN (E.). — Le floridoside chez les Floridées. *C.R. Acad. Sc.* 1933, **197**, 1688.
- COLIN (H.) et AUGIER (J.). — Les glucides solubles de *Lemanea nodosa* Kütz. *C.R. Acad. Sc.* 1932, **195**, 1042.
- COLIN (H.) et AUGIER (J.). — Floridoside, tréhalose et glycogène chez les algues rouges d'eau douce (*Lemanea*, *Sacheria*). *C.R. Acad. Sc.* 1933, **196**, 423.
- COLIN (H.) et AUGIER (J.). — Un glucide original chez les Floridées du genre *Polysiphonia*, le d. mannoside α du 1-glycérate de sodium. *C.R. Acad. Sc.* 1939, **209**, 1450.
- COLLYER (D.M.) and FOGG (G.E.). — Studies on fat accumulation by Algae. *J. Exp. Bot.* 1955, **6**, 256.
- COLLYER (D.M.). — Method for determination of fat percentage in unicellular algae. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 1962, **42**, 485.
- COMBES (R.). — La forme et la localisation des réserves chez les végétaux producteurs d'huile. Oléagineux : déc. 1946, 185.
- DEBUCH (H.). — Über die Fettsäuren aus Spinatchloroplasten. *Z. Naturforsch.* 1961, **16b**, 246 ; *Z. Naturforsch.* 1961, **16b**, 561 ; *Experientia* 1962, **18**, 61.
- DELSAL (J.-L.) et MANHOURI (H.). — Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1955, **37**, 1041 et articles suivants.
- DEUTICKE (H.J.), KATHEN (H.) et HARDER. — Analyse des lipoides d'algues. *Naturwissenschaften* 1949, 60.
- DUCKET (G.) et VAN DE WALLE (G.). — Nouvelles techniques de dosage du phosphore. *Annales de Physiologie végétale* 1959, **2**, 201.
- DUPÉRON (R.). — Les glucides des graines oléagineuses. Leur rôle au cours de la germination. *Rev. gen. Bot.* 1954, **61**, 261.

- EAVES (A.). and MUNDAY (W.A.). — The use of anion - exchange resins for the removal and recovery of non-hydrocarbon constituents from hydrocarbons. *J. Appl. Chem.* 1959, 145.
- ENTEMAN (C.). — The preparation of tissue lipid extracts. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1961, **38**, 534.
- FELDMANN-MAZOYER (G.). — Céramiacées de la Méditerranée occidentale. Thèse Alger 1940.
- FELDMANN (J. et G.). — Sur le métabolisme du glycérol chez les Rhodophycées. *C.R. Acad. Sc.* 1945, **220**, 467.
- FELDMANN (J.). — Inventaire de la flore marine de Roscoff, 1954. Supplément 6 aux travaux de la station biologique de Roscoff.
- FELDMANN (J.). — Remarques sur la systématique actuelle des Algues : *Uppsala Univ. Arsskrift.* 1958, **6**, 59.
- FELDMANN (J.). — Précis de Botanique 1963. Collection dirigée par P. GRASSÉ, Masson Edit. Paris.
- FERRARI (R.A.). — Photosynthesis of the Lipids. Thèse 1959. *Ann. Arbor. Michigan et Disser. Abst.* 1959, **20**, 1562.
- FERRARI (R.A.). and BENSON (A.A.). — The path of carbon in photosynthesis of the lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961, **93**, 185.
- FLEURY (P.) et LECLERC (M.). — La méthode nitro-vanado-molybdique de Misson pour le dosage colorimétrique du phosphore. Son intérêt en biochimie. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1943, **25**, 201.
- FOGG (G.E.). — The metabolism of Algae 1953. Methuen and Co. Edit. London.
- FOGG (G.E.). — Photosynthesis and formation of fats in a diatom. *Ann. Bot.* London 1956, **20**, 265.
- FOLCH (J.), LEES (M.) and SLOANE-STANLEY (G.H.). — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, **226**, 197.
- FRI TSCH (F.E.). — The structure and the reproduction of the Algae. T. II. 1945. Cambridge University Press.
- GIRAUD (G.). — Les infrastructures de quelques algues et leur physiologie. *J. Microscopie* 1962, **1**, 251.
- GIRAUD (G.). — La structure, les pigments et les caractéristiques fonctionnelles de l'appareil photosynthétique de diverses algues. Thèse 1963, et *Physiol. Vég.* 1963, **1**, 203.
- GUÉGUEN (E.). — Les constituants glucidiques des Algues rouges. Thèse Paris. Faculté de Pharmacie 1931 et *Ann. Inst. Océanogr.* 1931.
- GUÉGUEN (E.). — L'amidon floridéen chez *Furcellaria fastigiata*, ses variations saisonnières 1936. Extrait du livre Jubilaire dédié au professeur Lucien DANIEL.
- GUILLERMOND (A.), MANGENOT (G.) et PLANTEFOL (L.). — Traité de Cytologie végétale, 1933. Le François Edit. Paris.
- HENRY (M.-H.). — Contribution à la recherche des glucides solubles et des lipides chez les Floridées 1949. D.E.S. Paris.
- HILDITCH (T.P.). — Chemical constitution of natural fats. Chapman and Hall L.T.D. 664 p. London 1956.
- HORNING (E.C.), KARMEN (A.) and SWEeley (G.C.). — In « The Chemistry of fats and other lipids » 1964, **7**, 210.

- HORNSTEIN (I.), ALFORD (J.A.), ELLIOTT (L.E.) and CROWE (P.F.). — Determination of free fatty acids in fats. *Anal. Chem.* 1960, **32**, 540.
- ISHIBASHI (M.) et YAMAMOTO (T.). — Inorganic constituents in seaweeds. *Records of Oceanographic works in Japan* 1960, **5**, 55.
- IWAMOTO (H.) and SUGIMOTO (H.). — Fat synthesis in unicellular Algae. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan* 1958, **22**, 410.
- KATES (M.) and EBERHARDT (F.M.). — Isolation and fractionation of leaf phosphatides. *Canad. J. Bot.* 1957, **35**, 895.
- KATES (M.). — Chromatographic studies of the lipid components of leaves. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 1959, **1**, 238.
- KATHEN (H.). — Über die Ermittlung der chemischen Konstitution von Algenlipoiden mit Hilfe der absorptions method. *Arch. für Mikrobiologie* 1950, **14**, 601.
- KELLY (P.B.), RAISER (R.) and HOOD (D.W.). — The origin of the marine polyunsaturated fatty acids. Composition of some marine plankton. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1959, **36**, 104.
- KÜTZING (F.T.). — *Phycologia generalis*. Leipzig 1843.
- LAUR-HENRY (M.-H.). — Recherches histochimiques relatives aux lipides d'une Rhodophycée d'eau douce : *Lemanea nodosa* Kütz. *C.R. Acad. Sc.* 1957, **244**, 2187.
- LAUR-HENRY (M.-H.). — Variations de la teneur en acides gras et en matières insaponifiables de l'huile de *Lemanea nodosa* Kütz, Rhodophycée d'eau douce, au cours de la croissance des appareils reproducteurs. Premiers essais de caractérisation de ces substances. *C.R. Acad. Sc.* 1959, **249**, 453.
- LAUR-HENRY (M.-H.). — A propos des lipides de *Lemanea nodosa*, Kütz, Rhodophycée Némalionale. Résumé paru dans *Bull. Soc. Franç. Physiol. végét.* 1959, **5**, 189.
- LAUR-HENRY (M.-H.). — Mise au point sur la nature des lipides de quelques Rhodophycées. Résumé paru dans *Colloques internationaux du C.N.R.S. n° 103*, p. 169. Dinard 1960. C.N.R.S. Edit. Paris, 1961.
- LAUR-HENRY (M.-H.). — Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude des acides gras de Rhodophycées. *C.R. Acad. Soc.* 1961, **253**, 966.
- LAUR-HENRY (M.-H.). — Modalités de l'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude des acides gras de Rhodophycées. « *Proceedings of the 4th International Seaweed Symposium* », p. 344. Biarritz 1961 paru 1964. Pergamon Press Edit.
- LAUR-HENRY (M.-H.). — Mise en évidence des différents composés lipidiques de Rhodophycées, par chromatographie sur couche mince d'acide silicique. *C.R. Acad. Sc.* 1963, **257**, 1501.
- LE BRETON (E.) et FERRET (S.). — Les acides gras essentiels. Rôle physiologique, contribution à l'étude de ce rôle. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, 1959, **XIII**, A 505.
- LEDERER (E.) et coll. — *Chromatographie* 1960. Masson Edit. Paris.
- LEFORT (D.), POURCHEZ (A.) et PAQUOT (C.). — Comparaison d'acides à fonctions secondaires diverses, ayant 18 atomes de carbone. « *Séparation immédiate et chromatographie* », *G.A.M.S.* 1962, 319.

- LEMIEUX (R.U.) and BAÜER (H.F.). — Réactif d'aspersion pour la détection des hydrates de carbone. *Anal. Chem.* 1954, **26**, 920.
- LEMIEUX (R.U.) and VON RUDLOFF (E.). — Periodate - permanganate oxidations I. Oxidation of Olefins. *Canad. J. Chem.* 1955, **33**, 1701.
- LINDBERGH (B.). — Low-molecular carbohydrates in Algae. *Acta chem. Scand.* IX, 1954, **8**, 869 ; *Acta chem. Scand.* X, 1955, **9**, 1093.
- LISON (L.). — Histochimie et cytochimie animales. Gauthier-Villars Edit. Paris 1953 et 1960.
- LOVERN (J.A.). — The fats of some aquatics plants. *Biochem. J.* 1936, **30**, 387.
- LOVERN (J.A.). — The chemistry of Lipids of biochemical significance 1957. Methuen and Co Edit. London.
- LOVERN (J.-A.). — Some significant advances in oils and fats Research in Great Britain during the past fifty years 1961. - 50 th Anniversary Meeting of the American oil Chemists' Society. New-Orléans.
- MACHEBŒUF (M.) and DELSAL (J.-L.). — Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans les matières organiques. *Bull. Soc. chim. Biol.* 1943. **25**, 116.
- MAGNE (F.). — Les réserves lipidiques des Rhodophycées. *C.R.Acad. Sc.* 1958, **246**, 2641.
- MANGENOT (G.). — Documents concernant « l'amidon » des Algues Floridées. *C.R. Soc. Biol.* 1921, **84**, 406.
- MANGENOT (G.). — Recherches sur les constituants morphologiques du cytoplasma des Algues. Thèse Paris 1922 et *Arch. Morph. gen. et exp.* fasc. 9, 325 p.
- MANGENOT (G.). — Sur l'amidon des algues Floridées. *C.R. Acad.Sc.* 1923, **176**, 183.
- MANGOLD (H.K.) and MALINS (D.C.). — Fractionation of fats, oils and waxes on thin layers of silicic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1960, **37**, 383.
- MANGOLD (H.K.). — Thin-Layer Chromatography of lipids. *J. Am. Oil chem. Soc.* 1961, **38**, 708.
- MARINETTI (G.V.). — Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides. *J. Lipid Research* 1962, **3**, 1.
- MEAD (J.-F.), KAYAMA (M.) and REISER (R.). — Biogenesis of Polyunsaturated acids in Fish. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1960, **37**, 438.
- METCALFE (L.D.) and SCHMITZ (A.A.). — Rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 1961, **33**, 363.
- MEUSE (B.J.D.), ANDRIES (M.) and WOOD (J.-A.). — Floridean starch. *J. Exp. Bot. G.B.* 1960, **11**, 129.
- MICHEL-DURAND (E.). — Le phosphore des Végétaux 1939. Collection : Les Problèmes Biologiques. P.U.F. Paris.
- MILLER (J.D.A.). — Fats and steroids, in « Physiology and Biochemistry of Algae » 1962, p. 357. Ralph A. Lewin Edit. Academic Press. New-York - London.
- MILNER (H. W.). — The fatty acids of Chlorella. *J. Biol. Chem.* 1948, **176**, 813.

- MIMA (H.), and KITAMORI (N.). — Adsorption chromatography of sucrose palmitates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1962, **39**, 546.
- MIWA (T.K.), MIKOLAJCZAK (K.I.), EARLE (F.R.) and WOLFF (I.A.). — Gas chromatographic characterization of fatty acids. *Anal. Chem.* 1960, **32**, 1739.
- MIWA (T.K.). — Identification of peaks in G.L.C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1963, **40**, 309.
- MULLAHY (J.-H.). — The morphology and cytology of *Lemanea australis* ATK. *Bull. Torrey Bot. Club* 1952, **79**, 393 et 471.
- NAUDET (M.) et coll. — Etudes sur la décoloration des huiles : *Rev. Franç. Corps gras.* 1960, nos 3-10-11 ; 1961, nos 4-7.
- NELSON (G.J.). — The lipid composition of normal mouse liver. *J. Lipid Research* 1962, **3**, 256.
- NOAILLES (M.C.). — Recherches écologiques et phytosociologiques sur quelques Rhodophytes d'eau douce. 1962, D.E.S., Paris.
- O'BRIEN (J.S.) and BENSON (A.A.). — Isolation and fatty acid composition of the plant sulfolipid and galactolipids. *J. Lipid Research* 1964, **5**, 432.
- OLLERO (A.) et SOTO (A.). — La aplicación de las resinas cambiadoras de iones como catalizadores, en la química de las grasas y sus derivados. *Grasas y Aceites* 1960, **11**, 29 et 91.
- PAQUOT (C.) et coll. — Méthodes analytiques des lipides simples. 1962, C.N.R.S. Edit. Paris.
- PASCHKE (R.F.) and WHEELER (D.H.). — The unsaturated fatty acids of the alga *Chlorella*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1954, **31**, 81.
- PEARSE (A.G.E.). — *Histochemistry* 1960. J. and A. CHURCHILL. Edit. London.
- PEIFER (J.J.). — A rapid and simplified method of analysis by thin layer chromatography using microchromatoplates. *Mikrochimica Acta* 1962, **3**, 529.
- PONS (W.A.), KUCK (J.-C.) and FRAMPTON (V.L.). — Bleaching of refined Cottonseed oil with modified alumina adsorbent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1963, **40**, 10.
- PRIVETT (O.S.) and BLANK (M.L.). — Charring conditions for the quantitative analysis of mono, di, and triglycerides by thin layer chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1962, **39**, 520.
- SAVARY (P.) et DESNUELLE (P.). — Analyse chromatographique des mélanges contenant des acides gras et mono, di et triglycérides. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1954, 936.
- SCHARAPOW (N.I.). — Der Ölgehalt der Pflanzen in den Familien der Weltflora. *Biol. Zentralbl.* 1958, **77**, 740.
- SCHNEIDER (D.) et BOULOUX (M.). — Travaux pratiques de Physiologie Végétale. *O.R.S.T.O.M.* 1958.
- SHIBUYA (I.). — The glycolipids of Algae. Thesis 1960. Pennsylvania State University.
- SCHLENK (H.), MANGOLD (H.K.), GELLERMAN (J.-L.), LINK (W.E.), MORRISSETTE (R.A.), HOLMAN (R.T.), and HAYES (H.). — Comparative analytical studies of fatty acids of the Alga *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1960, **37**, 547.
- SIMS (R.P.A.) and LAROSE (J.A.G.). — The use of iodine vapor as a general detecting agent in the thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1962, **39**, 232.

- SIRODOT (S.). — Etude anatomique, organogénique et physiologique sur les algues d'eau douce et la famille des Lemnaceées. *Ann. Sci. Bot.* 1872, V, 5.
- STAHL (F.). — Dünnschicht Chromatographie 1962. Springer Verlag. Edit. Berlin.
- STOFFEL (W.), CHU (F.) and AHRENS (E.H.) — Analysis of long chain fatty acids by gas - liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1959, **31**, 307.
- THIVOLLE (L.). — Dosage du phosphore par molybdomanganimétrie. *Bull. Biol. Pharm.* 1938, 872.
- THOMAS (P.) et RAYMOND (D.). — Techniques de Biochimie 1958. Baillière Edit. Paris.
- TSUDA (K.), AKAGI (S.) and KISHIDA (Y.). — Discovery of Cholesterol in some red algae. *Science* 1957, **126**, 927 ; *Chem. Pharm. Bull. Japan* 1958, **6**, 101.
- ULRICH (R.). — Comparaison des lipides accumulés dans les péricarpes verts et dans l'albumen des graines de lierre (*Hedera helix*, L.). *C.R. Acad. Sc.* 1939, **208**, 665.
- VIOQUE (E.). — Cromatografia de capa fina y sus aplicaciones. *Grasas y Aceites* 1960, **11**, 223.
- VORBECK (M.L.), MATTICK (L.R.), LEE (F.A.) and PEDERSON (C.S.). — Preparation of methyl esters of fatty acids for gas liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1961, **33**, 1512.
- WAGNER (H.), HÖRHAMMER (L.) und WLOFF (P.). — Dünnschicht chromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. *Biochem. Z.* 1961, **334**, 175.
- WEENINK (R.O.). — Acetone-soluble lipids of grasses and other forage plants, I. Glycolipids of Red clover (*Trifolium pratense*) leaves. *J. Sci. Food Agric.* 1961, **1**, 34.
- WEENINK (R.O.). — Acetone-soluble lipids of grasses and other forage plants. II. Minor constituents of the acetone - soluble lipids of red clover (*Trifolium pratense*) leaves. *J. Biochem.* 1962, **82**, 523.
- WEENINK (R.O.). — Reaction of sulfoquinovose from red-clover lipids with anthrone. *Nature*, 1963, **197**, n° 4862, 62.
- WHITEHOUSE (M.W.), BRESLER (A.E.) and STAPLE (E.). — The use of iodine for detection of lipids. *J. Chromatog.* 1958, **1**, 385.
- WOLFF (G.) et WOLFF (J.-P.). — Méthodes analytiques et de contrôle industriel des matières grasses 1953. Dunod Edit. Paris.
- WOLFF (G.) et WOLFF (J.-P.). — Application de la chromatographie en phase gazeuse au contrôle de la pureté des corps gras. *Rev. Franç. corps gras*, 1960, 73.
- WOLFF (J.-P.). — 1) Mises au point de chimie analytique pure et d'analyse bromatologique. 1958. 5^e série, Masson Edit. Paris.
- WOLFF (J.-P.). — 2) *Rev. Franç. Corps gras*, 1959, **6**, n° spécial, 13.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

“ La résonance magnétique nucléaire : Applications aux lipides des végétaux. ”

Vu et approuvé :

Paris, le 30 juin 1964

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

